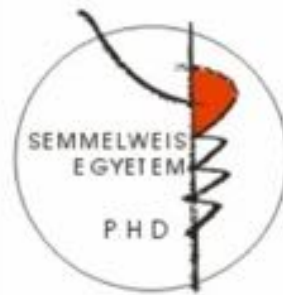


# mTOR (mammalian target of rapamycin) jelátviteli út aktivitás különbségek és azok jelentősége humán vastagbél-daganatokban

Doktori értekezés

**Sticz Tamás Béla**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Herszényi László, az MTA doktora, egyetemi docens  
Dr. Butz Henriett, Ph.D., szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Moldvay Judit, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Holub Marianna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2017

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Bevezetés.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1. Vastagbél daganatok klinikai jelentősége, jellegzetességei és kezelése .....</b>	<b>6</b>
I.1.1. Előfordulásuk gyakorisága.....	6
I.1.2. Makroszkópos morfológiai jellegzetességek .....	7
I.1.3. Szövettani típusaik .....	7
<b>I.1.3.1. Az adenocarcinomák morfológiai jellegzetességei.....</b>	<b>8</b>
I.1.4. Colorectális daganatok hisztokémiai és immunhisztokémiai sajátosságai ....	10
I.1.5. Vastagbél daganatok kialakulása, progressziója .....	10
<b>I.1.5.1. Colorectalis carcinogenesis – molekuláris genetikai jellegzetességek</b>	<b>10</b>
<b>I.1.5.2. Stádiumbeosztás .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.5.3. Rizikó tényezők.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1.5.4. Tünetek és Szűrés .....</b>	<b>15</b>
<b>I.1.5.5. Kezelés .....</b>	<b>17</b>
<b>I.1.5.5.1. Túlélés és Prognózis .....</b>	<b>18</b>
<b>I.2. mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarainak daganatbiológiai szerepe colon carcinomában .....</b>	<b>19</b>
I.2.1. Az mTOR, mint terápiás target .....	19
I.2.2. mTOR kináz és az mTORC1 és C2 komplexek szerkezete .....	20
I.2.3. mTORC1 és C2 komplexek aktivitásának szabályozása – „Upstream signaling” .....	22
I.2.4. mTORC2 szabályozása – „Upstream signaling” .....	24
I.2.5. mTORC1 szabályozó hatásai – „Downstream signaling” .....	25
I.2.6. mTORC2 szabályozó hatásai – „Downstream signaling” .....	28
I.2.7. mTOR gátlás .....	30
<b>I.2.7.1 Temsirolimus .....</b>	<b>32</b>
<b>I.2.7.2. Ridaforolimus .....</b>	<b>32</b>
<b>I.2.7.3. Everolimus .....</b>	<b>32</b>
<b>I.2.7.4. Újabb, tovább fejlesztett mTOR inhibitorok.....</b>	<b>33</b>

<b>I.2.7.5. Az mTOR gátlók lehetséges mellékhatásai .....</b>	<b>35</b>
<b>I.2.7.6. Daganatterápiás vizsgálatok mTOR gátlókkal szolid tumorokban, így colon carcinomákban.....</b>	<b>36</b>
<b>II. Célkitűzések.....</b>	<b>39</b>
<b>III. Anyag és Módszer.....</b>	<b>40</b>
<b>III.1. Humán biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata .....</b>	<b>40</b>
III.1.1. Biopsziás minták.....	40
III.1.2. Szöveti multiblokk („tissue microarray”) módszer és immunhisztokémia .	40
III.1.3. Statisztika.....	42
<b>III.2. <i>In vitro</i> vizsgálatok humán colon carcinoma sejtvonalakkal.....</b>	<b>42</b>
III.2.1. <i>In vitro</i> sejtvonalak .....	42
III.2.2. <i>In vitro</i> kezelések.....	43
III.2.3. A proliferáció és apoptózis vizsgálatok <i>in vitro</i> .....	43
III.2.4. Fehérjék expresszió vizsgálata – Immuncitokémia, Western blot, és Duolink festés .....	44
III.2.5. <i>In vitro</i> vizsgálatok statisztikai értékelése .....	46
<b>IV. Eredmények .....</b>	<b>47</b>
<b>IV.1. Humán colon carcinoma biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata .....</b>	<b>47</b>
IV.1.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok - humán colon carcinomák mTORC1 és mTORC2 komplexek aktivitás különbségei.....	47
IV.1.2. mTOR aktivitás összefüggése a betegek klinikai adataival, hosszútávú túlélésével .....	50
<b>IV.2. Humán colon carcinoma sejtvonalak <i>in vitro</i> vizsgálatának eredményei... </b>	<b>55</b>
IV.2.1. EGFR inhibitor rezisztencia kimutatása.....	55
IV.2.2. Colon carcinoma sejtvonalak <i>in vitro</i> rapamycin érzékenysége és mTOR aktivitása .....	58
IV.2.3. mTOR inhibitor kombinált kezelés hatása humán colon carcinoma sejtekre <i>in vitro</i> .....	62
<b>V. Megbeszélés.....</b>	<b>65</b>
<b>V.1. Humán colon carcinomás szövetminták vizsgálatainak eredményei.....</b>	<b>65</b>
<b>V.2. <i>In vitro</i> eredményeink jelentősége.....</b>	<b>70</b>

<b>VI. Következtetések .....</b>	<b>73</b>
<b>VII. Összefoglalás.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII. Summary .....</b>	<b>75</b>
<b>IX. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>76</b>
<b>X. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>95</b>
<b>XI. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>97</b>

**Rövidítések jegyzéke**

ALL	akut lymphoblastos leukémia
APC	adenomatous poliposus coli
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	adenozin trifoszfát
BAD	Bcl-2-associated death promoter
CEA	carcinoembryonális antigén
CIMP	CpG-sziget metilátor fenotípus
CIN	kromoszóma instabilitás
CRC	colorectalis carcinoma
DAB	diaminobenzidine
Deptor	DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DNS	dezoxiribonukleinsav
4EBP1	eukarióta iniciációs faktor 4E (eIF4E)-kötő fehérje 1
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF4E	eukarióta iniciációs faktor 4E
EMA	European Medicines Agency
ER	endoplazmatikus retikulum
ER $\alpha$	ösztrogénreceptor $\alpha$
FAP	familiaris adenomatosis polyposis
FAT	Frap, ATM, TRRAP
FATC	FRAP-ATM-TTRAP
FDA	Food and Drug Administration
FOLFIRI	leucovorine + 5-FU + irinotecan
FOLFOX	leucovorine + 5-FU+ oxaiplatin
FRB	FKBP12-rapamycin-binding domén
HEAT	Huntington, EF3A, ATM, TOR
HNPCC	hereditary nonpoliposis colorectal cancer
HR	high Risk
HRa	adjusted high risk
IBD	inflammatory bowel disease
IGF	Insulin like growth factor

IHC	Immunhisztokémia
KD	Kináz domén
kDa	kilo Dalton
LOH	heterozigóta állapot elvesztése
MAM	mitokondriumhoz társult ER
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8)
MMR	mismatch repair
MSI	mikroszatellita instabilitás
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTOR	mammalian vagy mechanistic target of rapamycin
OSCC	orális laphámsejtes-carcinoma
PDK	protein dependens kináz
p-4EBP1	foszforilálz eukarióta iniciációs faktor 4E (eIF4E)-kötő fehérje
PI3K	phospho-inositide 3-kinase
PIP2	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PIP3	foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
p-mTOR	foszforilált mTOR
PRAS40	proline-rich AKT substrate 40 kDa
Protor-1/2	protein observed with Rictor-1/2
p-S6	foszforilált S6 fehérje
PTEN	phosphatase and tensine
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
REDD1	DNA damage response 1
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RSK1	p90 riboszomális S6 kináz 1
S6K1	riboszomális protein S6 kináz 1
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TFEB	transcription factor EB
TMA	Tissue Microarray
TSC	tubuláris szklerózis komplex
VEGF	vascular endothelial growth factor

## I. Bevezetés

A vastagbél-daganatok kezelése rendkívül sokat fejlődött az elmúlt évtizedben, javultak a terápiás eredmények, ennek ellenére a daganatos halálozások okai között még jelenleg is gyakori a vastagbél- vagy végbél-daganatok progressziója. A célzott terápiás kezelések nem hoztak igazi áttörést a betegek kezelésében, a túlélési eredmények javultak ugyan, de a progresszió, a recidíva, a gyógyszerrezisztencia megjelenése igen gyakori ebben a daganattípusban. A kezelésekkel szembeni rezisztencia az egyik legfontosabb tényező, ami a szisztémás daganatellenes kezelés sikereit megakadályozza. A rezisztencia mechanizmusok megismerése, a háttérben a daganat heterogenitás és/vagy a tumorevolúció eredményeként megjelenő szabályozási zavarok felismerése fontos feladat. Ebben nyújthat segítséget az mTOR aktivitás zavarok, ezen belül a két komplex aktivitás változásainak megismerése is. Az mTOR (mammalian vagy mechanistic target of rapamycin) kináz aktivitásának változása központi szerepet játszik a jelátviteli hálózatban. Hiperaktivitása hozzájárulhat a sejtek növekedéséhez, proliferációjához, túléléséhez és különböző anyagcsere változásaihoz is. Mindezek a változások elősegítik a sejtek környezeti alkalmazkodását és ezen belül hozzájárulhatnak a különböző rezisztencia mechanizmusok kialakulásához is a daganatos progresszió során. Sok vizsgálatban figyelték meg az mTOR gátló kezelések rezisztencia mechanizmusok áttörésében kimutatható szerepét. Az értekezésben az irodalmi adatok és saját eredményeim alapján az mTOR jelátviteli út aktivitásának daganatbiológiai jelentőségét foglaltam össze humán vastagbél-daganatok esetében.

### I.1. Vastagbél-daganatok klinikai jelentősége, jellegzetességei és kezelése

#### I.1.1. Előfordulásuk gyakorisága

A colorectalis carcinomák (CRC) férfiak és nők körében is a harmadik leggyakoribb daganatot jelentik mind előfordulásukat (incidencia), mind a mortalitási adatokat tekintve. A GLOBOCAN National Cancer Incidence Statistic adatai alapján 2012-ben világszerte 1,82 millió tüdő-, 1,67 millió emlő- és 1,36 millió colorectalis daganatot diagnosztizáltak [1]. A férfiak körében előforduló daganatok 9,4%-a, nőknél 10,1%-a CRC. A vastagbélrák fiatal korban ritkán fordul elő, a betegség általában ötven év felett jelentkezik. A CRC előfordulási gyakorisága nem egyenletes a különböző

földrajzi területeken, ez a daganattípus jellemzően a fejlett, nyugati típusú világ betegsége. A CRC előfordulása kb. tízszeres a fejlett világban a fejlődő országokhoz képest [2, 3]. A betegség gyakorisága a különböző földrajzi területeken dinamikusan változik: jó példa erre Japán, Szingapúr és Kelet-Európa, ahol a gazdasági fejlődéssel párhuzamban a CRC előfordulási gyakorisága megkétszereződött az 1970-es évek óta [4]. Míg Magyarországon 50 évvel ezelőtt 15/100,000 volt a betegség incidenciája, addig az 2015-ös adatok szerint jelentős, közel 4-szeres emelkedés tapasztalható az esetek számában az elmúlt évtizedekben (incidencia 59/100,000) [2]. A vastagbél-daganatok Magyarországon második helyen szerepelnek a halálozási statisztikában, évente közel 5000 beteg hal meg ebben a betegségben.

### **I.1.2. Makroszkópos morfológiai jellegzetességek**

A vastagbél-daganatok ~50%-a a sigmabélben és a rectosigmoideális átmenetben alakul ki, viszont az utóbbi időben egyre több daganat fordul elő a proximalis colon területén is. Az anatómiai lokalizáció a klinikai jellemzőkkel is összefügg: a coecumban vagy a colon ascendensben kialakuló daganatok jellemzően idősebb korban jelennek meg [5].

Makroszkópos megjelenésüket tekintve a vastagbél daganatok lehetnek polipszerű (exophyticus) vagy ulceratív daganatok. A lumen beszűkülése főleg a distalis szakaszban megjelenő daganatokra jellemző a körkörös kialakuló, szalvétagyűrűre emlékeztető megvastagodás eredményeképpen. A CRC-k mindkét típusa idővel beszűri a bélfalat és tömött tapintatú szövetszaporulatként megjelenik a bél serosa felszínén [5, 6].

### **I.1.3. Szövettani típusaik**

A vastagbél hámeredetű daganatai lehetnek benignus vagy malignus elváltozások. A polypus kifejezés a bél lumenébe betüremkedő terimét jelöli, amely lehet malignus fenotípussal nem rendelkező ún. nem neoplasztikus polypus, a hám proliferációja és dysplasiája következtében létrejövő, rákmegelőző állapotnak tekinthető adenoma vagy akár malignus adenocarcinoma [6]. Az adenomatosus polipok szövettani megjelenésüket tekintve több alcsoportba sorolhatók, úgymint tubuláris, villosus, tubulovillosus és sessilis fogazott adenomák [7]. Számos bizonyíték van arra, hogy az adenomák jelenléte invazív colorectalis adenocarcinoma kialakulására hajlamosít. Az adenoma-carcinoma



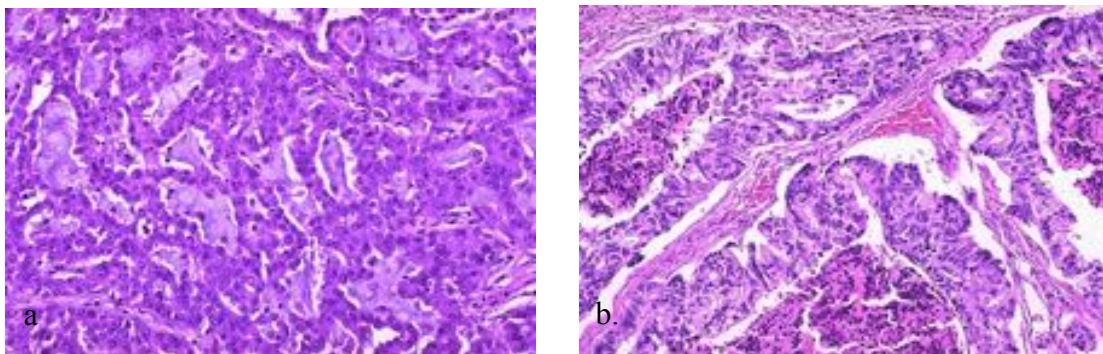
átalakulás legfontosabb rizikótényezői a polypus mérete, szövettani típusa és a hámdysplasia súlyossága [6].

A malignus vastagbél-daganatok leggyakrabban előforduló típusa az adenocarcinoma, ami a colorectalis carcinomák több mint 90%-át jelenti. Az adenocarcinomákon belül számos ritka szövettani alcsoport is létezik pl. mucinosus adenocarcinoma, pecsétgyűrűsejtes carcinoma, medulláris carcinoma; a WHO klasszifikációban az adenocarcinomák mellett laphámcarcinoma, adenosquamosus carcinoma, kissejtes neuroendocrin carcinoma és differenciálatlan carcinoma is szerepel [7].

#### **I.1.3.1. Az adenocarcinomák morfológiai jellegzetességei**

Az adenocarcinomákat általános mirigyképzés jellemzi, ami karakterisztikus szövettani sajátosság, ez továbbá a tumorok grádus-meghatározásának alapját is képezi [8]. Jól-differenciált daganatokban akár a tumor több mint 95%-a mirigyképző sajátosságot mutathat, míg a rosszul differenciált adenocarcinomákban 50%-nál kisebb a mirigyállomány aránya. A diagnosztizált colorectalis adenocarcinoma-k leggyakrabban a közepesen differenciált csoportba tartoznak, ahol a mirigyállomány aránya megközelítően 70%. A jól differenciált carcinomák kb. 10%-át, míg a rosszul differenciált carcinomák kb. 20%-át teszik ki a colorectalis adenocarcinomáknak [8].

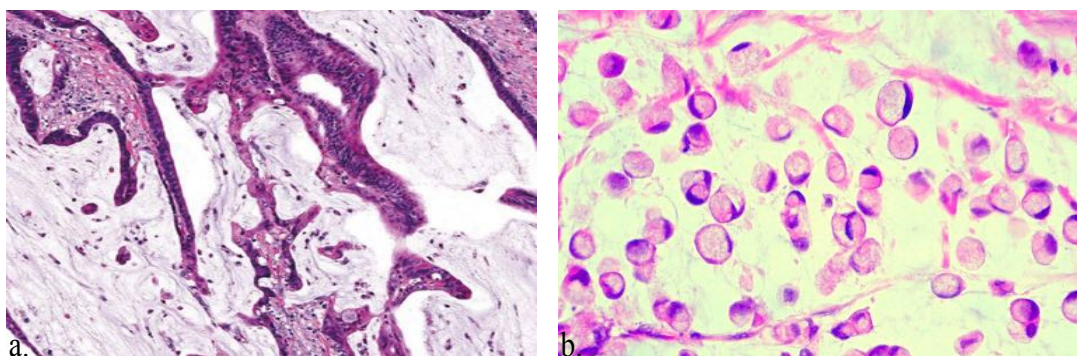
Az invazív adenocarcinomák sajátossága, hogy a daganatsejtek a muscularis mucosae rétegét áttörve beszűrnek a submucosát [8]. Az invázió mértéke a TNM meghatározás alapját képezi (1. ábra) [9]. A tumor akár a bélfal minden rétegét



**1. ábra.** Szövettani kép: a: Adenocarcinoma (400X), b: Adenocarcinoma „piszkos nekrozissal” (200X) [10]

beszűrheti, ráterjedhet a környező zsírszövetre, behatolhat a perineurális terekbe és betörhet a vénákba. Utóbbi prognosztikus jelentőséggel bír; rugalmasrost illetve simaizom aktin immunhisztokémiai festéssel jobban felismerhető [11-13].

A ritkább, de jellegzetes morfológiai képet mutató mucinosus adenocarcinómák a CRC-k közel 10%-át képezik. Ezekben a daganatokban a tumor több mint 50%-a extracelluláris mucinból áll, daganatsejtek mirigyes struktúrákat képeznek, amelyek jelentős mennyiségű mucint tartalmaznak (2.a. ábra). Azokat a adenocarcinómákat, ahol a mucinosus jelleg jelentős (>10%), de nem éri el az 50%-ot, mucinosus jellegű adenocarcinómának nevezzük. A mucinosus adenocarcinómákat általában mikroszatellita instabilitás jellemzi, gyakran „hereditary nonpolyposis colorectal cancer” (HNPCC) szindrómában szenvedő betegekben jelennek meg [7, 8]. Nőkben az előfordulási gyakoriság magasabb, mint a férfiak körében. A daganat jellegzetes előfordulási helye a proximalis colon [14].



**2. ábra.** Szövettani kép: a: Mucinosus (200X), ill. b: pecsétgyűrűsejtes adenocarcinoma (400X) szövettani képe hematoxin-eosin festéssel [10]

A pecsétgyűrűsejtes carcinoma a colorectalis daganatok még ritkább típusa, diagnózisa akkor állítható fel, ha a tumorsejtek legalább 50%-a intracitoplazmatikus mucint tartalmaz. A citoplazmában elhelyezkedő mucin tartalmú vakuolum a perifériára nyomja a daganatsejt magját, ez eredményezi a jellegzetes pecsétgyűrű-szerű megjelenést (2.b. ábra). Makroszkóposan – a gyomor pecsétgyűrűsejtes carcinomájához hasonlóan – a daganat általában beszűri a bélfalat, ún. linitis plastica jellegű megjelenést hozva létre. Mikroszkóposan leggyakrabban diffúz növekedés és legfeljebb minimális mirigyképzés jellemzi. A daganat általában rosszul differenciált és kedvezőtlen prognózisú. A legtöbb pecsétgyűrűsejtes carcinoma kialakulásának hátterében szintén mikroszatellita instabilitás áll [7, 8]. A további altípusokat nem mutatom be, mivel a dolgozatban a ritka

altípusok mTOR aktivitását nem vizsgáltuk (alacsony számuk miatt statisztikailag vizsgálható esetszám nem állt rendelkezésünkre).

#### **I.1.4. Colorectális daganatok hisztokémiai és immunhisztokémiai sajátosságai**

A CRC-k többsége mucin festéssel pozitív. A vastagbél daganataira a MUC1 és MUC3 expresszió jellemző, ezek immunhisztokémiai vizsgálata differenciáldiagnosztikai segítséget nyújthat. A colorectalis adenocarcinomák többségére CK7-negatív és CK20-pozitív immunfenotípus jellemző, ami megkönnyíti a más eredetű, elsősorban tüdő- és ovariumcarcinomáktól való elkülönítést. További immunhisztokémiai marker lehet a CDX2 és a CEA (carcinoembryonális antigén), azonban ezek nem kizárólag vastagbél-specifikusak [5, 8, 15, 16].

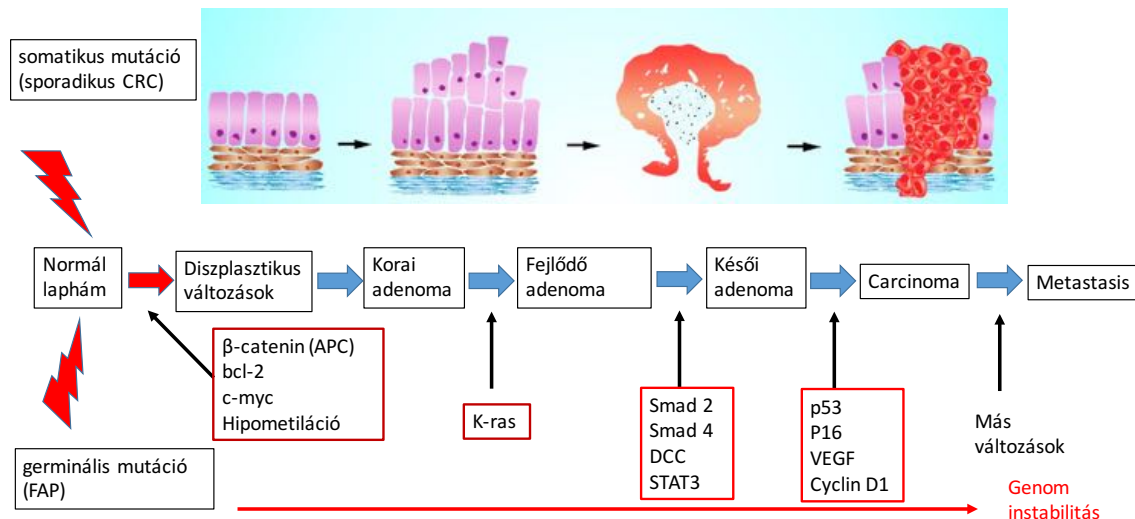
#### **I.1.5. Vastagbél daganatok kialakulása, progressziója**

##### **I.1.5.1. Colorectalis carcinogenesis – molekuláris genetikai jellegzetességek**

A vastagbélrák kialakulásában sporadikus, örökletes és környezeti tényezők egyaránt fontos szerepet játszhatnak. A daganatok hozzávetőlegesen 20%-a tartozik az örökletes csoportba, ezekben az esetekben családi halmozódásról vagy örökletes daganatszindrómáról egyaránt szó lehet. A colorectalis carcinomák 5-10%-a örökletes daganatszindrómák következménye, amelyek leggyakoribb típusai a familiáris adenomatous polyposis (FAP) és a hereditær non-polyposus colorectalis daganat (HNPCC) [17]. Mindkét daganatszindróma autoszomális domináns öröklődést mutat és a vastagbél-daganatok kialakulásának megnövekedett kockázatával jár. Az FAP az APC (adenomatous polyposis coli) gén mutációjának eredménye, a HNPCC a mismatch repair génnek örökletes mutációja következtében jön létre [18].

A CRC kialakulása alapvetően két fő, patogenetikailag elkülönülő útvonalon keresztül mehet végbe: egyrészt az adenoma-carcinoma szekvencia transzformáció során az APC/ $\beta$ -katenin útvonalon keresztül, másrészt a DNS-repair mechanizmusok sérülése következtében létrejött mikroszatellita instabilitás révén. A sporadikus CRC-k mintegy 80%-a az adenoma-carcinoma átalakulás következménye. Az ún. genetikai progresszió első lépése az APC tumorszuppresszor gén elvesztése, ezt követi a KRAS-mutáció kialakulása, a 18q21 delécia (érintett gének: DCC, SMAD2, SMAD4), majd a p53 gén elvesztése. A DNS-repair génnek eltérései csak a sporadikus daganatok 15-20%-ára

jellemzők, itt is a mutációk lépcsőzetes halmozódása jön létre. Sporadikus daganatokban általában az MLH1 és MSH2 gének érintettek, míg HNPCC esetén elsősorban az MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 és PMS2 gének némelyikének öröklött mutációja van jelen (3. ábra) [18-20].



**3. ábra.** Humán colorectális adenocarcinoma tumorigenezis modellje. Adenomatous polyposis coli (APC), vagy  $\beta$ -catenin mutációk iniciálják a neoplasztikus folyamatot. Az örökletes vagy korai mutációk megjelenését követően, a genom instabilitás és a környezeti terhelések következményeként a tumor progresszió során további gének mutációi jelennek meg a sejtekben (pl. K-ras, Smad 4 és p53). A gyakoribb, jól ismert genetikai változásokat piros keretekben tüntettem fel. *Li és mtsai, 2014 összefoglaló közleménye után* [21].

Az utóbbi években további a daganatok és így a colon carcinomák kialakulása szempontjából fontos mutációkat is leírtak. Ilyen a PI3K katalitikus alegységét kódoló PIK3CA gén aktiváló mutációja, amelynek szomatikus mutációját a vastagbél-daganatok 25%-ában megfigyelték, ez a PI3K/AKT/mTOR-jelút fokozott aktivitását eredményezi. A már említett mikroszatellita instabilitással jellemzett tumorok 90%-ában jelen van a TGF $\beta$ RII mutációja is. A TGF $\beta$  daganatbiológiai hatását kettősség jellemzi: míg a daganatképződés korai fázisában tumorszuppresszív hatású, így ebben a fázisban van jelentősége a receptor vagy a Smad4 funkcióvesztő mutációinak, addig később

mikrokörnyezeti hatásain keresztül a TGF $\beta$  segítheti a daganat progresszióját és az áttétképzést [19, 22, 23].

Az utóbbi években az epigenetikai tényezők szerepe is felértékelődött a colorectalis daganatok pathogenezisében. A vastagbél-daganatok egy részére jellemző bizonyos gének DNS metilációs mintázatának megváltozása. Az ún. CpG-sziget-metilátor fenotípusú colon carcinomákban (CIMP) több gén metilációs mintázat változása együttesen jelenik meg. Ezek az epigenetikai változások a genetikai mutációkkal együtt hozzájárulhatnak a CRC patogeneziséhez és a molekuláris heterogenitás kialakulásához. Ezeknek az epigenetikai változásoknak kutatása, feltárása diagnosztikus, prognosztikus és terápiás lehetőségek kifejlesztését segíti napjainkban [24].

#### **I.1.5.2. Stádiumbeosztás**

A CRC stádium meghatározása során megállapítják a tumor lokális kiterjedtségét (T), a regionális nyirokcsomóérintettségét (N) és az esetleges távoli áttétek meglétét (M), melyeknek prognosztikus és terápiás jelentősége van. A-stádiummeghatározás első lépése a tumorból történő szövettani mintavétel, ezt követi a nyirokcsomók és az esetleges távoli áttétek vizsgálata képalkotó eljárásokkal, elsősorban CT- és/vagy MR-alkalmazásával [25]. A daganat klinikai viselkedését differenciáltsága (grading) és szövettani megjelenése jelentős mértékben befolyásolja [26].

Jelenleg az American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control által javasolt TNM-beosztást alkalmazzák a CRC-k stádiumának meghatározására, korábban az Astler-Coller által módosított Dukes-féle stádiumbeosztást használták (1. táblázat).

- 1. táblázat.** Colon carcinoma-k stádiumbeosztása a TNM-rendszer szerint: a. a primer Tumor, b. a regionális nyirokcsomó, c. a távoli áttét szerinti beosztást mutatja. A táblázat d részében található a különböző stádiumok szerinti besorolás

**1. táblázat.****a. Primer Tumor (T)**

TX	A primer tumor nem értékelhető
T0	Nincs bizonyíték a primer tumorra
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelialis vagy lamina propria invázió
T1	Tumor megtámadja a submucosát
T2	A tumor érinti a musculus propriát
T3	A tumor áttöri a musculus propriát és áttérjed a környező szövetekbe
T4a	A tumor behatol a visceralis peritoneum felszínére
T4b	A tumor közvetlen behatol vagy kapcsolódik más szervekhez vagy struktúrákhoz

**b. Regionális nyirokcsomók (N)**

NX	Regionális nyirokcsomó érintettség nem értékelhető
N0	Nincs regionális nyirokcsomó metastasis
N1	Metastasis 1-3 regionális nyirokcsomóban
N1a	Metastasis 1 regionális nyirokcsomóban
N1b	Metastasis 2-3 regionális nyirokcsomóban
N1c	Tumorfelhalmazódás (-ok) a subserosában, mezentériában vagy nonperitonealizált pericolicus vagy perirectális szövetekben, regionális csomók metastasis nélkül
N2	Metastasis 4 vagy több regionális nyirokcsomóban
N2a	Metastasis 4-6 regionális nyirokcsomóban
N2b	Metastasis 7 vagy több regionális nyirokcsomóban

**c. Távoli metastasis (M)**

M0	Nincs távoli metastasis
M1	Távoli metastasis kimutatható
M1a	Metastasis kimutatható 1 szervben vagy egy oldalon (pl.: máj, tüdő, nem regionális nyirokcsomó)
M1b	Metastasis kimutatható több mint 1 szervben / oldalon vagy a peritoneumon

**1. táblázat.****d. Stádiumok**

Stádium	T	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C2
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Bármely T	Bármely N	M1a	D	D
IVB	Bármely T	Bármely N	M1b	D	D

**I.1.5.3. Rizikó tényezők**

A CRC-k kialakulását nem befolyásolható és módosítható kockázati tényezőkkel hozzák összefüggésbe. A nem befolyásolható rizikótényezők közé tartozik az életkor, az adenomatosus polipok vagy a gyulladásos bélbetegségek (IBD – inflammatory Bowel Disease) megjelenése, más családi kórelőzmény, öröklődő genetikai faktorok jelenléte is.

A CRC több mint 90%-a 50 évesen vagy idősebb korban jelentkezik (60 felettiekénél 50x-es az előfordulás gyakorisága a 40 év alattiakhoz képest) [27]. A Sporadikus CRC kb. 95%-a [4] a kórtörténetben már felismert polipokkal, adenomákkal összefüggésben jelenik meg [28]; ezekben az esetekben a latencia kb. 5-10 év [29, 30], ezért fontos az adenomák felismerése és eltávolítása [4, 31]. Colitis ulcerosában és Chron-betegségben a mucosa, bélfal teljes vastagságának gyulladása fokozza a CRC kialakulásának

valószínűségét (4-20-szoros kockázat) [4]. A betegek 20%-ában mutatható ki családi halmozódás, ami fokozott rizikót jelent. A különböző gének/génváltozatok és környezeti tényezők fontos szerepet játszanak a családi halmozódásokban, és bár erről egyre több ismeret áll rendelkezésre, pontos háttere sok esetben még mindig nem ismert [4].

A CRC-k kb. 5-10%-a ismert örökletes tényezők következménye, ilyen állapotok a Familiaris Adenomatous Polyposis (FAP) és a Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), másnéven Lynch Szindróma is. A HNPCC kialakulásában a DNS repair génmutációknak (pl. MLH1, MSH2 gének), míg az FAP kialakulásában a domináns öröklés menetét mutató APC (adenomatous poliposis coli) tumor szupresszor gén mutációjának van fontos szerepe [4]. Annak a valószínűsége, hogy egy ismert HNPCC-s betegben CRC alakuljon ki 40-es éveiben kb. 70-80% [30]. FAP-esetében több száz polip fejlődik ki, amelyek egyikében malignus transzformáció történik a betegek többségének 20-as éveiben, ha az adott bélszakaszt nem távolítják el [4, 32, 33].

Előbbi örökletes szindrómák mellett fontos kiemelni, hogy a colorectális carcinomára széles körben úgy tekintenek, mint “környezeti betegségre”. Mindez hangsúlyozza a rossz kulturális szokások, szociális tényezők és életviteli faktorok jelentőségét [3, 34]. A zsíros ételek, különösen az állati zsírok és a nagy mennyiségű hús fogyasztása fontos rizikófaktor [35, 36]. A táplálkozási szokások megváltoztatása 70%-al csökkentheti a tumor kialakulásának a valószínűségét [37]. Emellett számos adat támasztja alá, hogy a fizikai aktivitás is csökkenti a CRC kialakulásának az esélyét [38], ez megváltoztatja a test metabolikus aktivitását, csökkenti a vérnyomást és az inzulin rezisztenciát is [39, 40]. Míg a kevés mozgás és az elhízás emeli a szervezetben keringő ösztrogének mennyiségét, csökkenti az inzulin érzékenységet, növeli a tumor kialakulásának a kockázatát [4, 29].

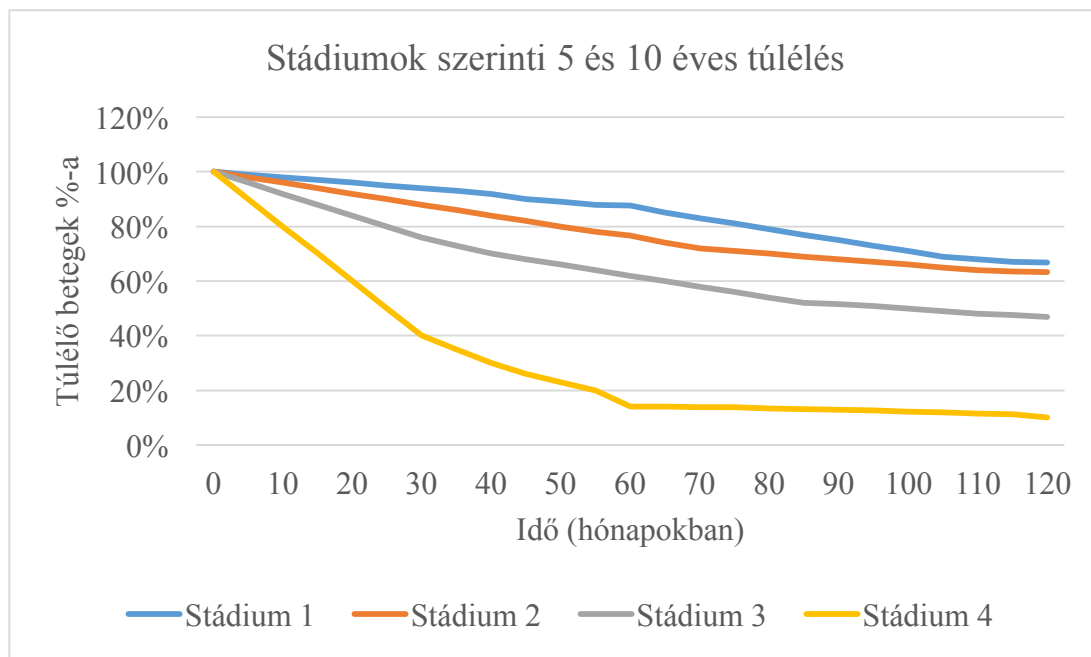
Jól ismert a dohányzás és az alkohol fogyasztás szerepe a CRC kialakulásában. Az alkohol és a dohányzás együtt sokkal károsabb, ennek oka például, hogy a dohányzás specifikus DNS mutációkat okozhat, amiknek a kijavítása kevésbé hatékony alkohol jelenlétében [4, 41-43]

#### **I.1.5.4. Tünetek és Szűrés**

A CRC legjellegzetesebb tünete a széklethabitus megváltozása, a székrekedés és a diarrhea váltakozása, később a véres széklet és az occult vérzés. Az esetek kb. 10-20%-ában az egyetlen észlelhető eltérés a vashiányos microciter anemia. Előfordulhat még hasi



fájdalom, étvágytalanság, puffadás, fogyás. Az elsődleges tüneteket gyakran már a távoli áttétek okozzák (máj, tüdő, központi idegrendszer). A vastagbél tumorok nagy része megelőzhető lenne a megfelelő tumorprevenció és szűrési eljárások alkalmazásával. Randomizált vizsgálatok bizonyították, hogy a Guaiac-teszt vagy más tesztekkel a széklet vér kimutatása 12-33%-al csökkentheti a CRC mortalitását [44]. A colonoscopus szűrés szerepét sem lehet eléggé hangsúlyozni, ez nem csak diagnózist és korai felismerést biztosít, hanem sok esetben a tumort megelőző precancerosus polipok eltávolítását is lehetővé teszi. A virtuális colonoscopia előnye, hogy nem invazív; hátránya, hogy sugárterhelést jelent [44]. A jelenlegi amerikai ajánlás szerint 50 év felett vagy fokozott kockázat esetén korábban javasolt a szűrést teljes colonoscopia-val 10 évente, széklet vértesszel évente, esetleg virtuális colonoscopia-val vagy sigmoidoscopia-val 5 évente elvégezni [45, 46]. A szűrés a korai diagnózis jelentőségét jól mutatják a stádium beosztással korreláló túlélési adatok (4. ábra).



**4. ábra.** Stádiumok szerinti várható öt éves túlélés, 1-es stádium: 87,79%; 2-es stádium: 76,79%; 3-as stádium: 62,24%, ill. 4-es stádium: 14,17%; ill. tízéves túlélés, 1-es stádium: 66,8%; 2-es stádium: 63,23%; 3-as stádium: 47,11%; ill. 4-es stádium: 10%. *Chen PC és mtsai nyomán [47].*

#### I.1.5.5. Kezelés

A CRC-k kezelése elsősorban sebészi beavatkozást igényel. Fontos, hogy lehetőség szerint a rezekció épben történjen és ne maradjon vissza tumorszövet. Megkülönböztetünk R0 rezekciót, amikor nem marad vissza Tumor, R1 állapotot, amikor a patológiai vizsgálat tumoros sejteket mutat a rezekciós szélben és R2 állapotot, amikor tumor marad vissza a betegben, utóbbi esetében palliatív operációról beszélünk. A távoli áttét és nyirokcsomó érintettség nélküli esetekben a sebészi kezelés önmagában is elegendő lehet, ahol egyre nagyobb teret nyernek az úgynevezett “minimálisaninvazív” laparoscopia-s műtétek.

A sikeres sebészi beavatkozás után a II. és a III stádiumú CRC-s betegek esetében 25-60%-ban alakul ki recidív tumor, esetleg távoli metastázis [48]. Előbbi esélyét csökkenti a műtét előtti neoadjuváns, illetve a sebészi beavatkozást követő adjuváns kemoterápia és sugárterápia. A jelenlegi standardok szerint a III. stádiumú CRC-s betegek kezelésének az alapja a fluoropyrimidine bázis alapú kemoterapikumok alkalmazása orális vagy intravénás formában, kiegészítve leucovorinnal [49, 50]. A II. stádiumú betegek is részesülhetnek kemoterápiában, de ennek szükségességéről az adatok nem egyértelműek; magas kockázatú betegeknél opcionálisan adható kemoterápia [51].

A disszeminált metastatikus vastagbélrák jelenlegi kezelésére a következő hatóanyagokat használják önállóan vagy kombinációban: 5-FU, leucovorine, capecitabine, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, ziv-aflibercept, ramucirumab, regorafenib, trifluridine-tipiracil, pembrolizumab és nivolumab. Ezek hatásmechanizmusa széles skálát fed le a DNS replikáció gátlásától a vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF), ill. az epidermális növekedési faktor (EGFR) aktivitásának gátlásáig [50].

Jelenleg a CRC-k adjuváns kezelése a FOLFOX (leucovorine+5-FU+oxaliplatin) vagy FOLFIRI (leucovorine+5-FU+irinotecan) standardok szerint történik [52]. Az Egyesült államokban a betegek általában FOLFOX kezelést kapnak, mint első vonalbeli kezelés. A FOLFIRI-t második vonalban adják, ha csak nem áll fenn valami más betegség is, mint például a neuropathia, ebben az esetben a FOLFIRI a választandó kezelés [53].

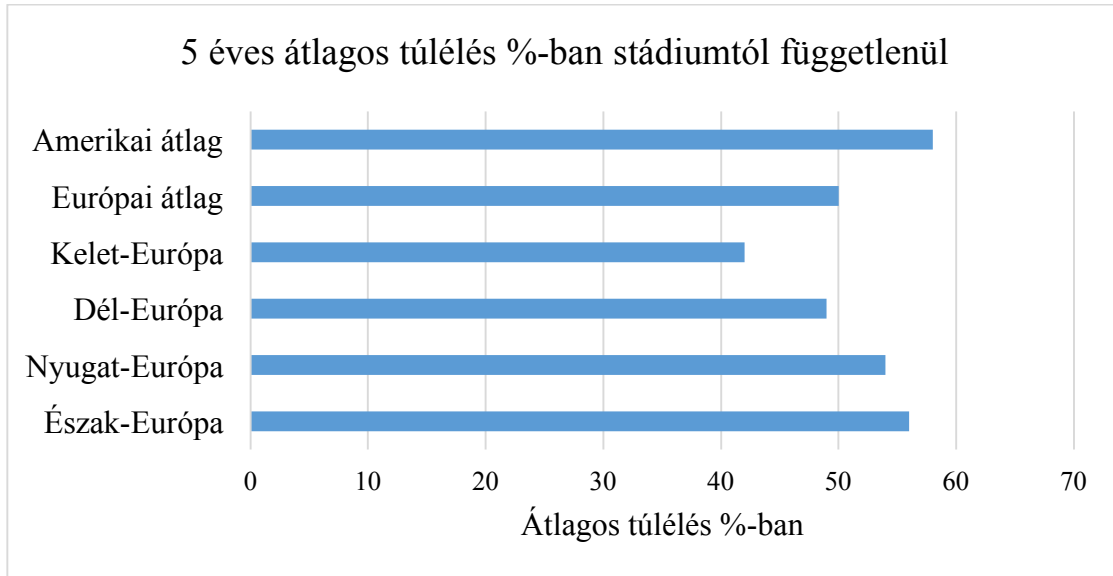
Napjainkban a molekuláris onkológia gyors fejlődésének köszönhetően előtérbe kerültek a biológiai terápiás lehetőségek, így vastagbél-daganatok EGFR, ill. VEGF gátlása monoklonális antitest kezeléssel. A Cetuximab egy kiméra, egér/humán anti-

EGFR készítmény, míg a Panitumumab egy teljes mértékben emberi eredetű antitest [54, 55]. A FOLFIRI terápiát is gyakran egészítik ki Cetuximab adásával [56]. Cetuximab K-RAS onkogén mutáció esetén, a várható rezisztencia miatt nem adható. Vannak azonban a RAS vad típusú betegek között olyanok, akik az anti-EGFR terápiára nem reagálnak, ilyenkor feltételezik pl. a BRAF mutációk szerepét [57]. A Bevacizumab monoklonális antitest célpontja a VEGF, az új erek képződését gátolja a tumorokban [58].

A gyakori kemoterápia rezisztenciának számos oka lehet. Az egyik legfontosabb, a tumor heterogenitása. A különböző tumorsejt klónok eltérő genetikai hibákat hordoznak, így a kezelés közben az adott körülményekhez legjobban alkalmazkodó sejtek szelektálódnak ki, élnek túl, de emellett a kezelés is eredményezhet új mutációkat és más genetikai vagy epigenetikai változásokat [59-61]. A munkámban is vizsgált PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út aktivitás változásának szerepe a carcinogenezisben, tumorprogresszióban és a terápia rezisztenciában nem ismeretlen, eddig is sok szempontból kutatott terület [62].

#### **I.1.5.5.1. Túlélés és Prognózis**

A CRC-s betegek túlélése nagymértékben függ a diagnosztizált betegség stádiumától (4. ábra). Az 5 éves túlélés ~90% a korai stádiumú betegeknél, 70% a regionális áttétes betegek körében, míg csupán 10% azoknál, akiknél távoli áttétek már megjelentek. Az 1960-as évektől minden stádiumú betegek kezelésének eredményei javulnak, jelentősen nőtt a betegek túlélése. Világszerte azonban óriási különbségek vannak a túlélési adatokban. A legmeghatározóbb különbségek az eltérő diagnosztikus és terápiás lehetőségekből eredhetnek. Az USA-ban az 5 éves túlélés 1995 és 2000 között több mint 10%-al javult, 63%-ra a nőknél és 64%-ra a férfiak esetében [63] (5. ábra).



**5. ábra.** A várható 5 éves túlélés a különböző régiókban %-ban kifejezve, stádiumtól függetlenül. *Allemani és mtsai nyomán* [64].

## **I.2. mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarainak daganatbiológiai szerepe colon carcinomában**

### **I.2.1. Az mTOR, mint terápiás target**

Az mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) kináz fehérje a jelátviteli hálózaton belül integrálja számos sejtfelszíni receptor útvonalának különböző extracelluláris jeleit és a sejt aktuális állapotát monitorozó szignálok hatásait, így központi szerepet játszik a sejtek növekedésének, proliferációjának, túlélésének és anyagcseréjének szabályozásában. A PI3K/Akt/mTOR útvonal szabályozási zavara a legkülönbözőbb folyamatokban (pl. tumorképződés, angiogenezis, inzulin rezisztencia, zsírsav szintézis vagy immunsejtek aktivációja) és számos betegség esetében ismert. Hatásait és szerepét a szervtranszplantáció során a szervek kilökődésében, a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásában és rosszindulatú daganatok esetében megfigyelt változásokban ismerjük legjobban [65].

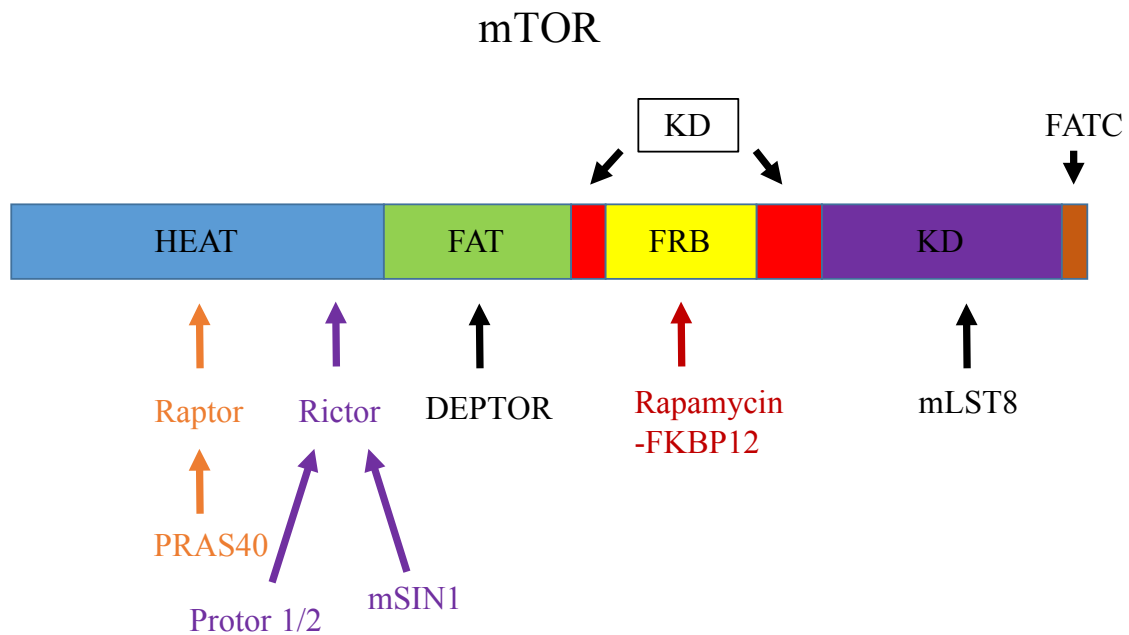
mTOR gátlókat már évek óta alkalmaznak a szervtranszplantált betegek immunszuppresszív [66, 67], és bizonyos szolid tumorok terápiás kezelésében is (pl. vese-sejtes carcinoma, köpenysejtes lymphoma, neuroendokrin carcinoma, emlőrák, glioblastoma multiforme és endometrium carcinoma), a legújabb fejlesztésű mTOR gátló kezelések is ígéretes eredményeket mutatnak a klinikai vizsgálatokban [68]. A

temsirolimus és az everolimus EMA (European Medicines Agency) – és az FDA (Food and Drug Administration) által jóváhagyott terápiás mTOR gátló készítmények a vesesejtes carcinoma kezelésére, de az mTOR inhibitorok megjelennek bizonyos emlődaganatok kombinációs kezelésében, a köpenysejtes lymphomák vagy más kórképek esetében is. A Waldenström makroglobulinaemia vagy rheumatoid arthritis esetében is vannak adatok arról, hogy hatékonyan alkalmazható az mTOR gátló kezelés [69-73].

### **I.2.2. mTOR kináz és az mTORC1 és C2 komplexek szerkezete**

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerin-threonin kináz nevét a múlt század végén, a 70-es években a Húsvét-szigeteken (Rapa Nui) felfedezett gátlószeréről kapta. A rapamycint először egy talajból izolált *Streptomyces hygroscopicus* baktérium fajból izolálták és gombaellenes majd később immunszuppresszív hatóanyagként jellemezték, target fehérjéjét, magát a kinázt pedig csak később azonosították. Az mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) egy 289 kilodaltonos (kDa) szerin/treonin protein kináz, a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) családba tartozik és két különböző multiprotein komplex formában fordul elő a sejtekben [74, 75]. A két komplexnek struktúrális felépítése és funkciója is különböző.

Az mTOR kináz C-terminális része a kináz domén (KD), míg a fehérje N-terminális részén HEAT (Huntington, EF3A, ATM, TOR) motívumok ismétlődéseit figyelhetjük meg, ennek különböző fehérje-fehérje interakciókban van szerepe. A fehérje további részét FAT (Frap, ATM, TRRAP), FRB (FKBP12-rapamycin-binding domén) és FATC (FRAP–ATM–TTRAP) domének alkotják. A kináz domén ATP (Adenozin trifoszfát) kötő résszel rendelkezik, míg a rapamycin az FKBP12 fehérjén keresztül képes bekötni az FRB doménhez és ezen keresztül gátolja a komplex kináz aktivitását (6. ábra) [76, 77].



**6. ábra.** Az mTOR kináz domén szerkezete és az mTORC1 és a C2 komplexek doménjeihez kötődő fehérjék.

Az mTOR kináz domén szerkezetét bemutató ábra alatt a C1 illetve C2 komplexben is megtalálható vagy mindkét komplexhez kapcsolódó fehérjéket fekete, az mTORC1 komplexre jellemzőket narancssárga, míg az mTORC2 specifikusakat lila színű nyilak jelölik (a nyilak arra a doménre mutatnak, ahova az adott fehérje kötődik). Az FKBP12 fehérje és ehhez kapcsolódó rapamycin – az mTORC1 komplex specifikus gátlószere – csak az mTORC1 komplexhez képes kötődni, a kétféle fehérje komplex eltérő szerkezete miatt. *Hare és mtsai közleménye alapján* [77].

Az mTORC1 komplexben az mTOR kináz, az mLST8 vagy GβL-ként is ismert (mammalian lethal with Sec13 protein 8) fehérje; valamint a komplexben specifikus Raptor, mint vázfehérje (Regulatory associated protein of mTOR) található. A Raptor egy 149 kDa tömegű fehérje, amely az mTOR-hoz a HEAT ismétlődéseknél kapcsolódik. A Raptor nemcsak az mTOR kinázzal, hanem az mTORC1 target S6K1 (riboszomális protein S6 kináz 1) és a 4EBP1 fehérjével (eukarióta iniciációs faktor 4E (eIF4E) -kötő fehérje 1) is kapcsolatba kerülhet, így a Raptor olyan állvány fehérjéként (“scaffolding protein”) működik, amely megkönnyíti az mTOR kináz és target fehérjéinek kapcsolódását [78]. Az mTOR és az LST8 az mTORC1 és az mTORC2 komplexben is

megjelenik. Az mLST8 kötődik az mTOR kináz C-terminális részéhez, az adatok arra utalnak, hogy az mLST8 szükséges az mTOR kináz megfelelő működéséhez, valamint az mTOR és a Raptor közötti kapcsolat stabilizálásához az mTORC1-ben [77]. A PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) negatív szabályozói a komplex aktivitásának. Az AKT foszforilálja a PRAS40 molekulát, az leválik a komplexből és így felszabadul az mTORC1 aktivitása a gátlás alól [79-81].

Az mTORC1 és az mTORC2 hasonló nagyságú komplexek (mTORC1 1,2 MDa, az mTORC2 1,4 MDa). Az mTORC2 a következő proteinekből áll: mTOR kináz; Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR); mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein); Protor-1/2 (protein observed with Rictor-1/2); mLST8 [76]. A Rictor, a komplex specifikus eleme, kiesése az mTORC2 szétesését eredményezi, ami azt sugallja, hogy hasonló állvány funkciót tölt be a mTORC1 komplexben található Raptorhoz. A Rictor az mTORC2 magjában lokalizálódik. Több bizonyíték is létezik arra, hogy a Rictor és a mSIN1 egymást stabilizálják és ezáltal megteremtik az mTORC2 szerkezeti alapjait [65]. A Rictor és az mSIN1 közösen szabályozzák az mTORC2 egyik fontos feladatát, az AKT foszforilálását [82]. A Protor-1/Protor-2 az mTORC2-höz a Rictoron és az mSIN1-en keresztül kötődhet, de a jelenlétük nem feltétlenül szükséges a komplex összeszereléséhez [83]. A Deptor ugyan úgy, mint az mTORC1 esetében, az mTORC2-nél is a negatív regulátor szerepét tölti be [65, 84]. A komplex térszerkezete is teljesen eltér az mTORC1 komplexétől, így az FKBP-12-n keresztül a rapamycin nem tud kötni ebben a komplexben az mTOR kinázhoz, így hatását direkt módon gátolni nem képes.

### **I.2.3. mTORC1 és C2 komplexek aktivitásának szabályozása – „Upstream signaling”**

Az mTOR kináznak kulcsfontosságú szerepe van a sejt életét befolyásoló mechanizmusok regulációjában. Az mTORC1 pozitív módon szabályozza a sejtnövekedést és a proliferációt számos anabolikus folyamat elősegítésével (például a proteinek és lipidek bioszintézise, valamint a katabolikus folyamatok, mint az autophagia gátlása).

Számos „upstream” útvonalat ismerünk, amelyek az mTORC1-aktivitását szabályozni képesek. Ilyen például több növekedési faktor-jelátviteli útvonal, az

aminosavszint, a sejten belüli energia (ATP)-szintek és a stressz [85]. Több negatív szabályozó fehérjéje van az így kialakuló jelátviteli hálózatnak. A legismertebb tumorsuppresszor gének egyike a PTEN (phosphatase and tensin) is egy ilyen negatív regulációs eleme a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli tengelynek. A receptor aktivációt követően a PI3K foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP3) alakítja, ezt gátolja a PTEN (tensin homolog deleted on chromosome 10). A PIP3 - PIP2 egyensúlyon keresztül a PI3K aktivitás a PIP3 mennyiségének fokozásán keresztül az útvonal aktiválódását indíthatja el, míg a PTEN ennek a folyamatnak a negatív szabályozója. Az foszforilációs kaszkádban a PI3K aktivitás emelkedést követően a fehérjék foszforilációjának sorozatát a protein dependens kináz (PDK), majd AKT szerint-threonin kináz fehérje aktivációja követi. A PDK1 az Akt-ot a Thr308 pozícióban foszforilálja. A tubuláris szklerózis komplex (TSC) az Akt egyik legjobban ismert target fehérjéje a jelátviteli hálózatban. A TSC1/2, szintén tumorsuppresszorok, kulcs negatív szabályozói a jelátviteli hálózatnak. A komplex felépítésében részt vesz a TSC1 (Hamartin néven is ismert), TSC2 (más néven Tuberin) és TBC1D7. A komplex mTOR gátló funkcióját a Rheb GTPase-on keresztül fejtik ki, Rheb GTP kötött formáját GDP kötött inaktív formává alakítja, ez megakadályozza az Rheb mTOR kináz aktiváló foszforilációját az mTORC1-ben [86]. Amennyiben a különböző növekedési faktorok, például az IGF-1 (Insulin like growth factor) és az inzulin aktiválják a foszfatidilinozitol 3-kinázt (PI3K). Ezután bekövetkezik a downstream effektorok, a PDK1 és Akt (más néven protein kináz B / PKB) aktiválódása, majd az Akt több helyen foszforilálja a TSC2-t, gyengíti a TSC1-el való kapcsolatát és destabilizálja a TSC1/TSC2 komplexet, felfüggeszti a komplex Rheb gátló hatását. Az Rheb felszabadulva a TSC1/2 komplex gátlás alól aktiválva, foszforilálja az mTOR kinázt a C1 komplexben. Az Akt az mTORC1 komplex aktivitást negatívan befolyásoló PRAS40 foszforilálásával is segíti az mTORC1 komplex aktivitásának hatásait, alapvető feladata tehát az mTORC1 komplex aktivitásnak fokozása, számos negatív regulátor hatásainak felfüggesztésén keresztül [77].

Több daganat esetében ismert hiperaktív, a tumornövekedést segítő szignálok a Wnt, a TNF $\alpha$  vagy az EGFR útvonal, PI3K-tól független TSC1/2 komplexet gátló hatása. A Ras-Erk MAPK útvonalban az Erk képes közvetlenül foszforilálni és inaktiválni a



TSC2-t a Ser664-en vagy foszforilálni a p90 riboszómális S6 kináz 1-et (RSK1) és annak hatásán keresztül foszforilálni, inaktiválni a TSC2-t [77].

Az aminosavszintek az mTORC1 funkció kritikus szabályozói, csakúgy, mint az mTORC1 komplex lizoszómális lokalizációja. Az aminosavak koncentráció viszonyai (elsősorban az arginin és a leucin mennyisége), a sejtek aminosav ellátottsága meghatározza az mTORC1 lokalizációját. A Rag GTPázok központi szerepet játszanak ebben a szabályozásban. Amennyiben bizonyos aminosavak szintje alacsony, akkor az mTORC1 komplex a RAG fehérjéken keresztül nem kapcsolódik a lizoszómák külső felszínéhez. A lizoszómális lokalizáció hiányában pedig az RHEB fehérje aktiválódása (RHEB-GTP) ellenére sem történik meg az mTOR kináz, illetve az mTORC1 komplex aktivációja, és ez növekedési faktorok jelenlétében is az mTORC1 aktivitást korlátozó hatás lehet [87].

A sejt alacsony energiaszintje, az aminosavak hiányához hasonló negatív szabályozója az mTORC1 aktivitásának. Ha az ATP szint alacsony, az aktiválja az AMPK-t, ami foszforilálja a Raptort, ez megváltoztatja az mTORC1 komplex szerkezetét, és gátolja az mTORC1 aktivitást. Az aktivált AMPK előbbieket mellett foszforilálja a TSC2-t a Thr1227 és Ser1345 pozícióban, ami egy a TSC1/2 komplex aktivitását, stabilitást fokozó, az mTORC1 aktivitását gátló hatás.

Az alacsony oxigénszint és más stressz hatások szintén csökkentik az mTORC1 aktivitását. Az oxigénszint többféle útvonalon befolyásolja az mTORC1 aktivitást. Enyhe hipoxia esetén az ATP szint csökkenése aktiválja az AMPK mTOR aktivitást csökkentő hatásait. Ettől függetlenül a hypoxia a “DNA damage response 1” (REDD1) transzkripciójának fokozását is eredményezi, ami a TSC2 gátló hatásainak felszabadításán, illetve a 14-3-3 fehérjéken keresztül gátolja az mTORC1 aktivitását [77].

#### **I.2.4. mTORC2 szabályozása – „Upstream signaling”**

Az mTORC1-hez hasonlóan az mTORC2 komplex aktivitását is szabályozzák a növekedési faktor útvonalak, például az inzulin és az IGF-1. Bizonyos eredmények szerint az mTORC2 komplexben található mSIN1 1 és 2-es isoforma, a komplex inzulin szenzoraként is működhet. Kimutatták, hogy az mSIN1 kritikus mediator bizonyos növekedési faktorok számára, amelyek az mTORC2-t aktiválják. A PI3K jelátviteli útvonalban a membrán kötött PIP3 az mSIN1-hez a PH doménen keresztül kötve, és befolyásolja, aktiválja az mTORC2 komplexet [88]. A fokozott PI3K aktivitás segíti az

mTORC2 riboszómális lokalizációjának kialakulását, ha a sejtekben elegendő riboszóma áll rendelkezésre. Az mTORC2 komplex aktivitásának szabályozásában a TSC fehérjéknek speciális szerepe van, míg a TSC gátolja az mTORC1 aktivitást és funkciókat, addig bizonyos sejtvonalakban (pl. MCF-7 emlő carcinoma sejtvonal) a TSC komplex szükséges az mTORC2 aktiválásához, és olyan fizikai interakciót mutattak ki az mTORC2 és a TSC között, ami az Rheb funkciójától független [77].

#### **I.2.5. mTORC1 szabályozó hatásai – „Downstream signaling”**

A proteinszintézis szabályozásában az mTORC1-nek kulcsszerepe van. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája a 4E-kötő fehérje (4EBP1) és az S6 kinázok, a p70S6K – S6K1 és a p90S6K - S6K2 izoformák.

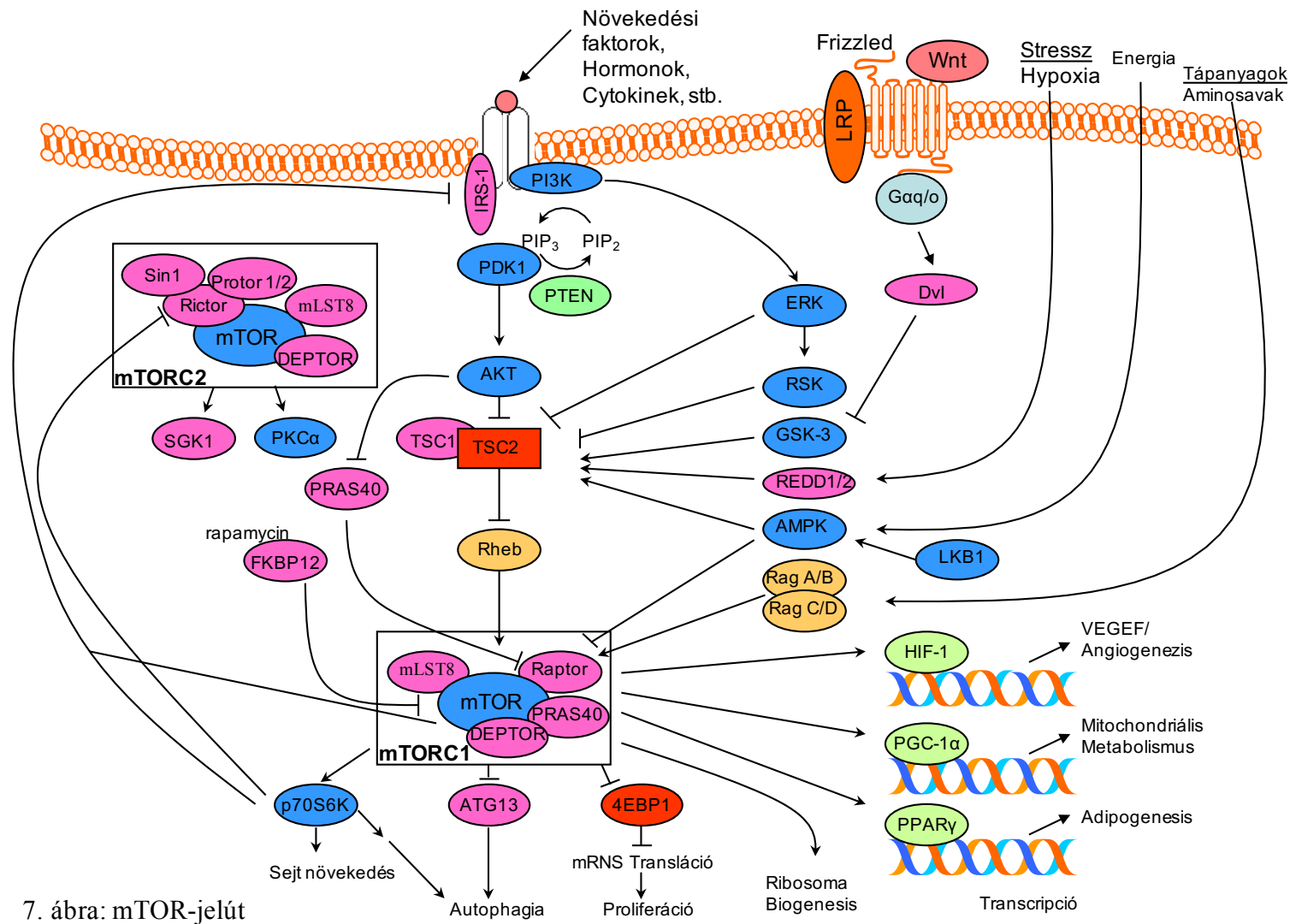
A p70-S6K1 több foszforilációs motívummal rendelkezik, a Thr389 foszforilációja mTORC1 függő, míg a kináz maximális aktivitásáért felelős Thr229 motívum foszforilációja a PDK1 foszforiláció következménye. Az aktív S6K1/2 több olyan protein foszforilációjának és aktivitásának a szabályozását végzi, amely a transzláció különböző folyamataiban részt vesz. Az S6K1 aktiváció elősegíti a transzkripciót pl. a riboszómális S6 fehérje foszforilálásával, de kapcsolatba kerül számos transzkripciós faktorról, például az ösztrogénreceptor  $\alpha$ -val (ER $\alpha$ ), valamint szabályozza riboszómális gének transzkripcióját is. Az mTOR útvonalban az S6K1-nek negatív feedback szabályozó szerepe is jól ismert, az mTORC1 aktivitás eredményeként megjelenő aktív S6K fehérje az IRS-1 expresszióját és aktivitását is befolyásolja, és foszforilálja a gátló szerin maradékokat a fehérjében. Előbbiekén túl az S6K számos pro-apoptotikus fehérje hatását függesztheti fel (pl. Bad, PDCD4). Az mTORC1 az S6K-n keresztül az mTORC2 aktivitását is befolyásolja, az S6K közvetlenül foszforilálja a Rictort, és így az mTORC2 funkcióit gátolja. Ezeket a hatásokat hozzák összefüggésbe azokkal a megfigyelésekkel, amikor az mTORC1 gátlás mellett az AKT sejtek túlélését támogató hatásait figyelték meg [89].

A 4EBP1-et az mTORC1 a Thr 37, 46 és 70 és a Ser 65 helyeken foszforilálja. Előbbiek hatására a 4EBP1 leválik a transzlációs iniciációs faktorról (eIF4E), így az felszabadul a 4EBP1 gátló hatása alól, lehetővé téve az eIF4E cap-függő transzlációt beindító hatásait [77].

Jól ismert az mTORC1 autofágiát gátló hatása is. Amennyiben egy sejt egészséges és rendelkezésre állnak a megfelelő feltételek (pl. tápanyag, energia), az mTORC1 aktív

és gátolja az autofágiát, az ULK1/2 és ATG13 kinázok foszforilációján keresztül. Jól ismert, az is, hogy ATP hiányában az AMPK gátolja az mTORC1 aktivitását, így az autofágia felszabadul a gátlása alól [77].

Az mTORC1 az anyagcserével kapcsolatos egyéb fontos celluláris folyamatok szabályozásában is részt vesz, így pl. fokozza a hypoxia indukálható faktor (HIF1 $\alpha$ ) transzkripcióját. Más transzkripcós faktorok termelésén keresztül a lipid metabolizmus és a pirimidinek szintézisének pozitív szabályozásában is fontos tényező [90] (7. ábra). Előbbi folyamatok elsősorban a glükóz illetve nukleotid anyagcsere folyamatait érintik, míg pl. az SREBP1 faktorok és a PPAR- $\gamma$  foszforilációján keresztül az mTORC1 aktivitás a lipid anyagcsere serkentésében is résztvesz.



7. ábra: mTOR-jelút

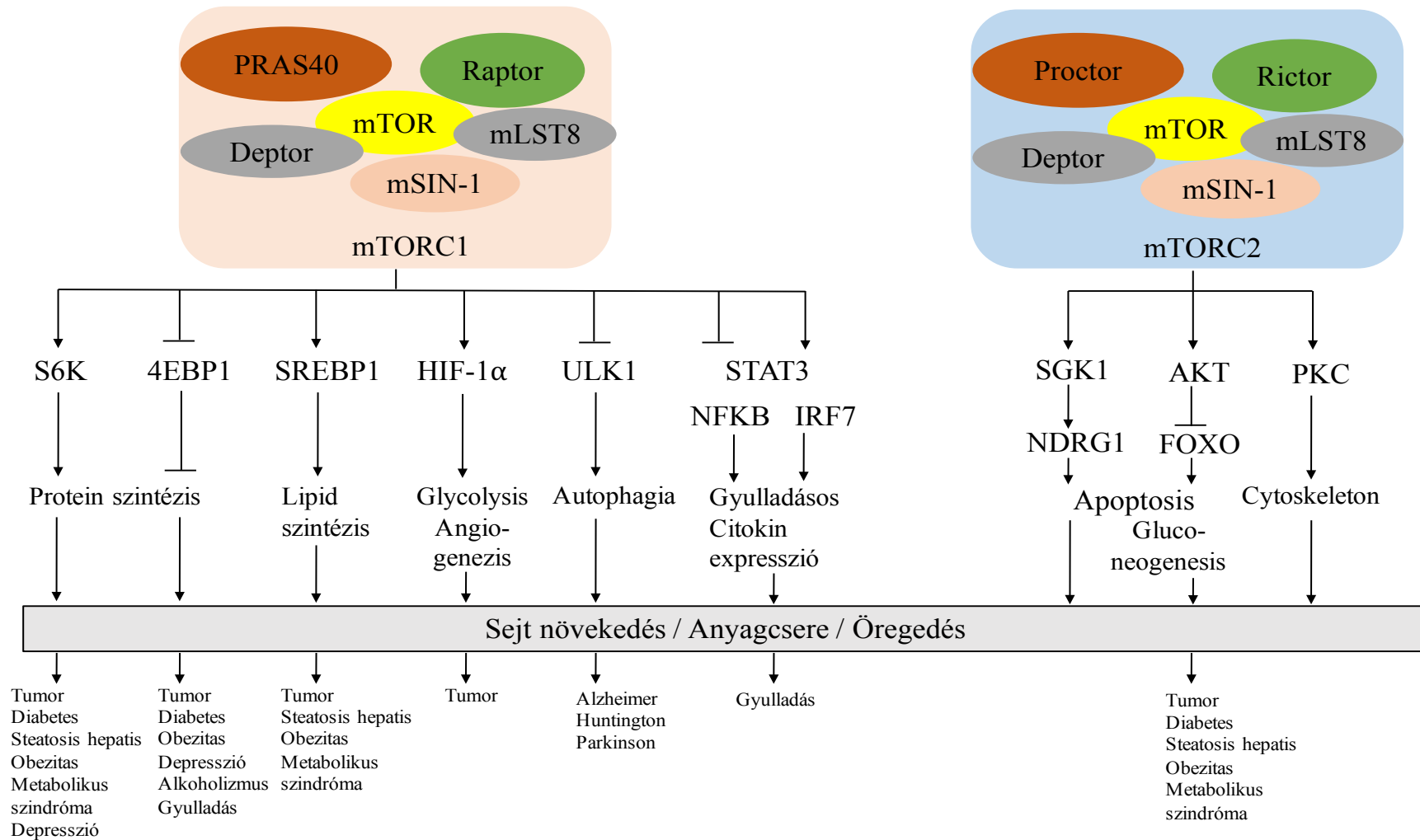
Az ábra magyarázatát és a legfontosabb rövidítések jelentését lásd a szövegben

### **I.7.6. mTORC2 szabályozó hatásai – „Downstream signaling”**

Az mTORC2 szabályozza az AGC kináz családba tartozó számos protein aktivitását. Az mTORC2 legrégebb óta ismert hatásai a sejt alakját, szerkezetét és morfológiáját érintik, az aktin citoszkeleton szerkezeti módosításán át, amit az AGC kináz családba tartozó PKC aktivitásának befolyásolásán keresztül kontrollálhat [77].

Az AGC kinázok közül az Akt az mTORC2 komplex egyik legfontosabb targetje. Az mTORC2 ugyan nem kizárólagos aktiválója az Akt-nak, de közvetlenül foszforilálja az Akt-ot a Ser473-on, amely az Akt maximális aktivitásának eléréséhez szükséges. [77]. Az Akt-nak számos jól ismert downstream effektora van, amelyek befolyásolják a sejtek túlélését, az angiogenezist és pl. a sejtek anyagcseréjét is (ilyen például a Bcl-2-associated death promoter (BAD); apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1); a transcription factor EB (TFEB) a lizoszomális biogenezis egyik kulcsszereplője; ill. a Caspase 9). Az mTORC2 komplexnek nemcsak az Akt-on, hanem az AGK kináz családba tartozó SGK1 aktiválásán keresztül is vannak az apoptózist szabályozó hatásai. Például, a FoxO3a-n keresztül, vagy a Na<sup>+</sup> ioncsatornák fehérjeinek működésének szabályozásán keresztül [91]. Az előbbi fehérjéken keresztül az mTORC2 befolyásolhatja például Th1 és Th2 lymphocyták és egyéb sejtípusok differenciálódását is [92].

Külön érdekesek a sejtanyagcsere szabályozásra irányuló legújabb vizsgálatok, amelyek az mTORC2 riboszómális lokalizációja mellett [71] feltárták a komplex szerepét az endoplazmatikus retikulum (ER)-hoz tartozó, úgynevezett mitokondriumhoz társult ER-ban, MAM-ban is. Ez a sub-kompartment a kalcium és a lipid transzfer kulcsfontosságú része, így mTORC2 hiányában ezek a funkciók és a MAM integritása károsodhat [77] (8. ábra).



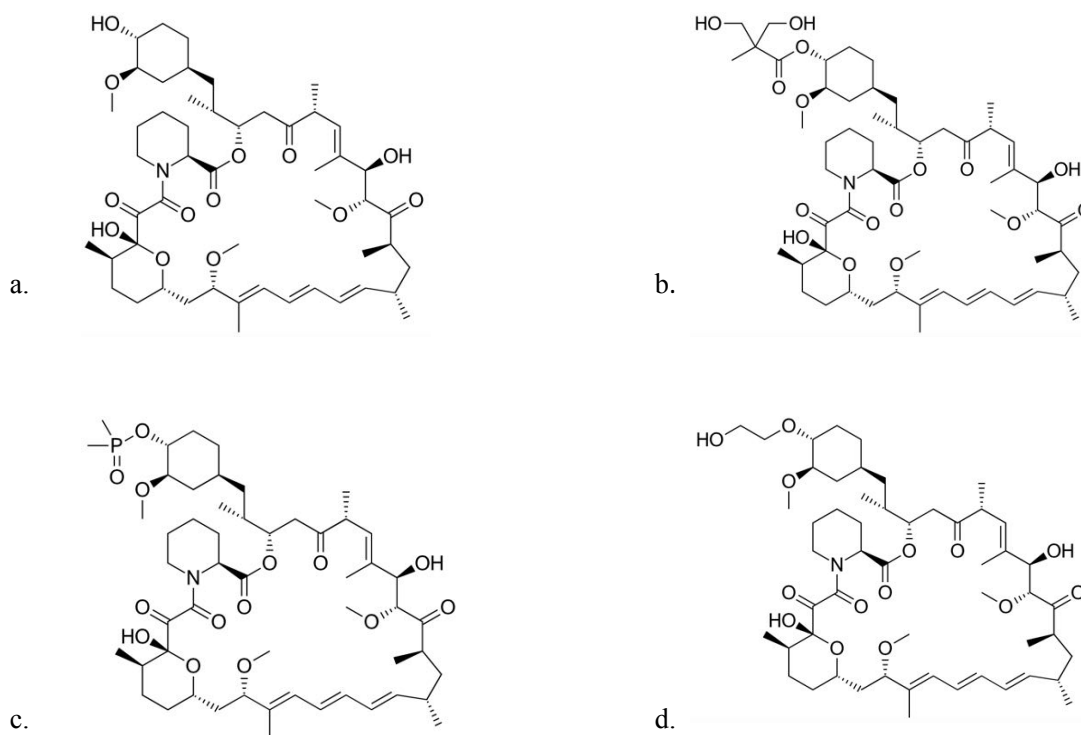
**8. ábra.** Az mTOR jelátviteli útvonal vázlatos áttekintése, aktivitásának szabályozó szerepe, tartget fehéjéi aktivitásának hatása a sejtfunkciókra és patofiziológiai folyamatokra. *Dazert és mtsai nyomán* [93].

### I.2.7. mTOR gátlás

Az 1970-es évek végén fedezték fel a rapamycint, az első mTOR gátlót, amiről később kimutatták, hogy immunszuppresszív és antiproliferatív hatású [94] (9. ábra). Az elmúlt évtizedben számos betegség kezelésében tesztelték hatásait. Az első, és jelenleg legszélesebb körben használt vegyületek csoportja a rapamycin és származékai (analógjai), amelyeket "rapalog" néven is megkülönböztetünk. A rapamycin (Sirolimus) makrociklusos lakton, immunszuppresszív hatása arra vezethető vissza, hogy megakadályozza immunsejtek aktiválódását, osztódását. 1999-ben eredetileg immunszuppresszív gyógyszerként engedélyezték az USA-ban, transzplantációban, elsősorban veseátültetések során. A legújabb eredmények igazolják, hogy csökkenti a szervkilökődés esélyét, vesetranszplantáció után javasolt az immunszuppresszív terápia rapalog konverziója, a transzplantációt követő 2.-3. hónaptól. Nagy előnye a rapalog konverciónak, hogy a vesefunkciót negatívan nem befolyásolja és a műtét utáni rosszindulatú tumorok kialakulásának gyakoriságát is csökkenti. Ugyanakkor a fertőzések kockázatát nem csökkenti és az atípusos tüdő gyulladásos szövődmények mellett további mellékhatásai is egyre jobban jellemzettek, bár ezek elég jól menedzselhetők is [95].

Az mTOR gátlók hatásának vizsgálataiban kimutatták proliferáció gátló hatásait a legkülönbözőbb tumorsejtekben (pl. leukémiák, lymphomák, hasnyálmirigy, a vastagbél, a rhabdomyosarcoma és emlőtumorok). A Rapamycin (Sirolimus vagy Rapamune) mégsem került bevezetésre a malignus tumorok kezelésében. Ennek egyik oka, hogy farmakokinetikai tulajdonságai nem a legjobbak, rossz oldhatóság és kémiai instabilitás [77, 96] jellemzi. A rapamycin származékok, a rapalogok kedvezőbb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek: everolimus (RAD-001), temsirolimus (CCI-779), ridaforolimus (deforolimus, AB-23573) és zotarolimus (ABT-578). A rapalogok mindegyike gátolja az mTOR kinázt az mTORC1 komplexben [97]. A rapamycin az FKBP12 fehérjéhez kötődik, és ezen keresztül köt az mTORC1 kináz FRB régiójához. Az FKBP12-rapamycin komplex alloszterikus gátlóként működik, konformációs változást hoz létre az mTORC1 komplexben és az mTOR kinázban. Ennek következtében csökken az mTOR és a Raptor közötti kapcsolatok, kötések erőssége, ami gátolja az mTOR célmolekuláinak (S6K és 4EBP1) a foszforilációját, és párhuzamosan az mTOR kináz auto-foszforilációs szintje a Ser2481-en is jelentősen csökken az

mTORC1-ben (de nem mTORC2-ben). Az mTORC1 gátló rapamycin, illetve rapalógok elsődleges hatása a proliferáció gátlása, a sejtciklus G1-fázis blokkját kiváltva [94].



**9. ábra.** A rapamycin (a) és az ettől csak kis oldalláncokban különböző rapalógok: Temsirolimus (b), a Ridaforolimus (c), Everolimus (d) szerkezeti képlete [77].

A rapamycin és rapalógok antitum hatásai a sejtciklus gátló hatáson túl jelentkeznek például a fehérje-transzláció, angiogenezis gátló vagy metabolikus hatásokban is. A legújabb vizsgálatok alapján a rapalógok a vesedaganatok és köpenysejtes lymphomák mellett gátolja a daganatsejtek növekedését prosztatata- [98], és kissejtes tüdő carcinomában [99] valamint rhabdomyosarcomában [100] is. Hasonló mechanizmussal, az everolimus gátolja a sejtek növekedését akut lymphoblastos leukémiában (ALL) [101], valamint emlő [102] és orális laphámcarcinomában (OSCC) kezelésében [103].



### **I.2.7.1 Temsirolimus**

A temsirolimust 2007 óta az EU-ban engedélyezték a vesesejtes vesekarcinómák terápiájában [104], jelenleg már elsővonalbeli kezelésként is alkalmazhatják rossz prognózisú betegeknél. A temsirolimus mind orálisan, mind parenterálisan adható. A III. fázisú klinikai vizsgálatok adatai azt mutatták, hogy ebben a betegcsoportban a temsirolimus kezelés javítja a túlélést [105]. Emlőtumoros betegeknél a temsirolimus kezelés azonban a legjobb esetben is csak minimális túlélési előnnyel járt [106]. A temsirolimus pontosabb hatásmechanizmusát elsők között köpenysejtes lymphomák terápiájában igazolták, ahol a lymphoma progressziójában fontos szerepet játszó sejtciklus promotor cyclin D1 overexpresszió és az mTOR aktivitás direkt összefüggését mutatták ki [107]

### **I.2.7.2. Ridaforolimus**

Dagnatterápiában klinikai alkalmazása még nem engedélyezett, de a legkülönbözőbb malignus daganatokban tesztelik hatásait monoterápiában és kombinációban is. Fázis II. vizsgálatban a trastuzumabbal kombinációban anti-tumor hatást mutatott HER-2 pozitív, trastuzumab-refrakter metasztatikus emlőrákos betegeknél. A kombinált kezelésre adott válaszreakció antiproliferatív, tumornövekedés gátló hatásai sok a vizsgálatokba bevont esetben a rezisztencia megjelenése előtti, elsővonalbeli kezelés esetében is hatásosnak bizonyultak. Ez arra utal, hogy a rapalógok segíthetnek leküzdeni a trastuzumabbal szembeni rezisztenciát [108].

### **I.2.7.3. Everolimus**

Az everolimus egy sirolimus-származék, csupán egy C40-es pozícióban lévő hidroxietilcsoporttal különbözik a rapamycintől. A farmakokinetikai adatok alapján a felszívódása gyors és a biológiai hozzáférhetősége is jobb, körülbelül 16-20% (magasabb, mint a sirolimus 10% -14% -a). Az everolimus napi kétszeri adagolást igényel, mivel az eliminációs felezési ideje 32 óra; ez rövidebb, mint a sirolimus felezési ideje (62 óra). Az everolimus esetében azonban nem szükséges terhelési dózis, és az egyensúlyi állapotot gyorsabban, kb. 4 nap alatt el lehet érni, szemben a sirolimus 6 napjával [109]. Az everolimus alkalmazását 2009-ben engedélyezték olyan előrehaladott veserákokban, ahol VEGF-gátló kezelés mellett vagy az után recidív tumor alakult ki [110]. Ezenkívül használják még neuroendokrin pancreas tumorokban, illetve a tüdő, bél daganataiban és

a szívtranszplantációban [111] is. A kardiológiai gyakorlatban használatosak az everolimust kibocsátó stentek is, ezeket a katéterrel kitágított koszorúérbe vezetik, ahol folyamatosan adja le tartalmát, meggátolva a stent elzáródását [112].

#### **I.2.7.4. Újabb, tovább fejlesztett mTOR inhibitorok**

A rapalogókkal ellentétben, amelyek alloszterikusan gátolják az mTOR kináz funkciót, az ATP-kompetitív inhibitorok az ATP kötődést blokkolják és így mindkét mTOR komplex aktivitását gátolhatják (pl. PP242 inhibitor). Az mTOR és a PI3K hasonló szekvenciája miatt bizonyos kompetitív inhibitorok gátolhatják a PI3K-t vagy az Akt-ot is ugyanúgy, mint az mTOR-t. Ezek a gátlószerek, ún. duál inhibitorok általánosan csökkentik az útvonal aktivitását a PI3K-Akt-mTOR jelátviteli hálózati tengelyben, és csökkentik a visszacsatolások következtében megmaradó vagy fokozódó aktivitásokat is (Akt vagy mTORC2 aktivitások) [113]. Az NVP-BEZ235 és a PF-04691502 egyaránt duál PI3K-mTOR inhibitorok, melyek antiproliferatív hatását igazolták *in vitro* és *in vivo*, a jelátvitel egyéb hatásainak gátlása mellett [114]. Szerteágazó jelátviteli kapcsolatai és sokrétű hatásai miatt azonban mind a PI3K, mind az mTOR gátlása mellékhatásokkal járhat, amelyek súlyosságuk függvényében (ami jelentős egyéni különbségeket mutat) korlátozhatják az inhibitorok klinikai alkalmazását. Az NVP-BEZ235 vizsgálat II. fázisában pl. everolimus rezisztens neuroedokrin eredetű hasnyálmirigy tumoros betegeknél sok esetben a kezelést fel kellett függeszteni, mert a betegek a gyógyszert annyira rosszul tolerálták [115].

Számos ATP-kompetitív mTOR inhibitor, így az MLN0128, a CC-223, Torin1/2 és az ADZ2014 széleskörű tesztelése is zajlik. Az AZD2014 és az MLN0128 inhibitorokról kiderült, hogy egyaránt jó antiproliferatív és tumorelles hatásaik mind *in vitro*, mind *in vivo*. [116, 117]. A Bupralisib (BKM120) egy pan-PI3K inhibitor, gátolja a PI3K-családba tartozó kinázok többségét, így az mTOR kinázt. A PI3K gátlás pl. Bupralisib használatával, és az everolimus (mTORC1 gátló) kombinációk segíthetik a primer Trastuzumab vagy más célzott terápiás szerrel szembeni rezisztencia elkerülését vagy áttörését *in vivo* [118]. Egy még újabb, ún. harmadik generációs mTOR gátló a RapaLink hatásosan gátolja a tumor növekedést és a jelátvitelt mind a vad, mind a mutáns mTOR (a kináz domén vagy az FRB régiók mutációja) esetében, ahol a rapalogok és a ATP-kompetitív gátlók sem hatnak [119] (2. táblázat).

**2. táblázat.** Rapalogok és dual mTOR /PI3K inhibitorok lehetséges klinikai alkalmazásai [120]

Generáció	Név	Engedélyezés éve vagy jelenlegi fázis	Fejlesztő	Példák klinikai alkalmazás területeire
1.	Rapamycin (sirolimus)	1999	Wyeth-Ayerst	Akut vese allograft kilökődés / restenosis
1.	Everolimus (RAD001)	2003-2011	Novartis	Allograft kilökődés / előre haladott veserák/ tuberkulo skerosis / hasnyálmirigy neuroendokrin tumora, neurofibromatosis
1.	Temsirolimus (CCI-779)	2007-2008	Wyeth-Ayerst / Pfeizer	Előrehaladott vesesejtes veserák / köpenysejtes lymphoma
Dual Inhibitor	NVP-BEZ235 (dactloisib)	Fázis I/II.	Novartis	Metastatikus emlő tumor / hasnyálmirigy neuroendokrin tumora
Dual Inhibitor	GSK2126458	Fázis I/II.	Glasko Smith Klein	Előre haladott szolid tumorok / lymphoma
Dual Inhibitor	XL765	Fázis I/II.	Sanofi-Aventis, Exelixis	Glioblastoma multiforme / nem-kissejtes tüdőrák / metasztatikus emlő tumor
2.	AZD8055	Fázis I/II.	AstraZeneca	Előre haladott szolid tumorok / glioma / hepatocelluláris carcinoma
2.	INK128 / MLN0128	Fázis I/II.	Intelliknie	Előre haladott szolid tumorok / myeloma multiple / Waldenstrom macroglobulinémia
2.	OSI027	Fázis I/II.	OSI Pharmaceuticals	Előre haladott szolid tumorok / lymphoma
3.	RapaLinks	2016-ban fejlesztették ki	Rodrik-Outmezuine	Rapamycin és AZD8055 rezisztens sejtvonalakon valamint xenografton tesztelték

### 1.2.7.5. Az mTOR gátlók lehetséges mellékhatásai

Nagy kihívást jelent a célzott terápia során, így az mTORI kezelések esetében is a mellékhatások, toxicitási problémák klinikai menedzselése. Az mTOR gátló kezelések a hagyományos kemoterápiás szerekhez képest jobban tolerálható mellékhatásokat okozhatnak, de a targetjeik általános szerepe miatt a mellékhatásaik akár rendkívül súlyosak is lehetnek, a kezelések felfüggesztését is szükségessé tehetik. Azonban, míg a kemoterápiás kezelések adott időszakban terhelik a szervezetet és a tumor mentes állapothoz is vezethetnek, addig a célzott kezelések többsége, így az mTOR gátlók is önmagukban csak citosztatikus hatásúak. Előbbiek miatt a hosszú idejű kezelések időleges megszakítása szükségessé válhat, és a hatékonyság növeléséhez más típusú kezelésekkel szekvenciális alkalmazása, esetleg a különböző kombinációs kezelések citoxikus hatásának elérése kell legyen a cél. Fontos a mellékhatások felismerése és követése, menedzselése, a megfelelő időben a tünetek enyhítését célzó kezelés [121, 122]. Mellékhatásként 10%-ban előfordul enyhe vagy tünetmentes pneuminitis (emiat a betegek rendszeres légzéskontrollja javasolható a kezelés közben); immunszuppresszív hatásuk következményeként fokozott fertőzés veszély, vagy korábbi fertőzések (például: hepatitis B, gombainfekciók) aktivációja (ezért az előzetes kórtörténet ismerete is fontos). Egyéb gyakori mellékhatások még a bőrkiütések, hipofoszfátémia, hiperglikémia valamint a betegek közel felében megjelenő stomatitis, ezek a tünetek általában szteroiddal enyhíthetők [123] (3. táblázat).

**3. táblázat.** Leggyakrabban használt mTOR gátló rapalóg készítmények lehetséges mellékhatásai [123, 124]

Everolimus	pneumonitis, dyspnoe, fertőzések, stomatitis, mucositis, anémia, neutropenia, thrombocytopenia, hypercholesterinémia, hypertriglyceridémia, hyperglycémia, növekedett kreatinin, hypophosphatémia
Temsirolimus	anémia, hyperglycémia, hyperlipidémia, thrombocytopenia, növekedett kreatinin, hypophosphataemia

#### I.2.7.6. Daganatterápiás vizsgálatok mTOR gátlókkal szolid tumorokban, így colon carcinomákban

Onkológiai kezelések során, sajnos gyakran tapasztalható, hogy az addig hatásos kezelés után visszaesés következik be, illetve a recidív tumor a korábbi kezelésre már nem reagál. A PI3K/AKT útvonal fontos szerepet játszik az emlődaganatok progressziójában is, a 2-es típusú EGFR (HER2) túlexpressziója, az inzulinszerű növekedési faktor receptor és ösztrogén receptorok aktivációja fokozza az mTOR aktivitását. Ez az endokrin terápia, a citotoxikus kemoterápia és a trastuzumab [33, 34, 37] terápia elleni rezisztencia kialakulásához vezethet [74, 75, 118]. Az eddigi vizsgálatok alapján feltételezik, hogy ennek mechanizmusa az ösztrogén receptor és a növekedési faktor receptor jelátviteli utak közötti komplex molekuláris “cross-talk”-on keresztül valósul meg. Ez alapján a jelenlegi emlőtumor terápiás kezelések kiegészítése mTOR inhibitorokkal segíthet leküzdeni a szerzett rezisztenciát és/vagy visszaállítani a terápiás érzékenységet. Az everolimust az EMA és az FDA is jóváhagyta az előrehaladott hormonreceptor (HR) pozitív, HER-2 negatív emlőrákban kombinációs kezelésként az exemestánnal, endokrin terápia után. Emlődaganatokban a trastuzumab rezisztencia kapcsolódik a PTEN mutációs funkció vesztéséhez, ami a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal szabályozatlan aktiválásához vezet [69].

A PI3K/AKT/mTOR útvonal kóros aktiválódása a colon carcinomák kialakulásában és progressziójában, valamint gyógyszerrezisztenciájában is fontos szerepet játszik, ezért felmerült itt is az mTOR gátlás lehetősége. *In vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy rapamycin kezelést követően más jelútvonalak (MAPK kináz/ERK) is aktiválódtak és gyakran megjelent a K-Ras mutáció colon carcinoma sejtvonalakban [125]. Az mTORC2 gátlásával colon carcinoma sejtek proliferációját, valamint xenograft modellekben a tumorképződést sikerült gátolni [126, 127]. Genetikailag módosított egér modellekben dual inhibitor NVP-BEZ235 kezeléssel a tumorok méretének csökkenését sikerült elérni [128]. Ugyancsak kimutatták, hogy a dual inhibitor NVP-BEZ235 gátolja a sejt proliferációt és az inváziót humán colon carcinoma sejtekben [129]. Jelenleg a CRC kezelése során a célzott anti-VEGF terápia (bevacizumab, aflibercept) vagy az anti-EGFR-terápia (cetuximab, panitumumab) általában oxaliplatin alapú terápiával történő kombinációra korlátozódik [130]. Felmerül, hogy más jelátviteli utak célzása, pl. mTOR terápiás gátlása everolimus-sal (RAD001) is alkalmazható az oxaliplatinnal kombinálva

a klinikai eredmények javítása érdekében. A klinikai vizsgálatok eddigi eredményei arra utalnak, hogy az mTOR gátló kezelés némi előnyt jelenthet a CRC-s betegek számára (4. táblázat). Fázis I-es vizsgálat során a RAD-001 kezelés hatására 9 hónapos betegség mentes túlélést írtak le [131]. A későbbi fázis II. vizsgálatban 25% -os objektív válaszarány mellett 5,9 hónappal hosszabb átlagos túlélést értek el. Előbbiek ellenére az everolimus CRC-ás betegek kezelése során eddig csak minimális előnyökkel járt. Az eddigi eredmények azt támasztják alá, hogy az mTOR inhibitorral végzett monoterápia klinikailag nem elég hatékony. Az mTOR inhibitorok hatásosabbnak bizonyultak citotoxikus kemoterápiával kombinálva, fázis I. klinikai vizsgálatban a RAD001 és az 5-fluorouracil kombinációja a refrakter CRC páciens populációban 7,4 hónappal hosszabb túlélést eredményezett [132]. Többféle szolid tumor fázis I. kezelésében az NVP-BEZ235 stabilizálta a betegséget a betegek egyrészében, több mint 16 héttel növelve a végstádiumú betegek túlélését (4/10 CRC-s beteg) [133].

**4. táblázat.** mTOR gátlókkal végzett és folyamatban fázisvizsgálatok colon carcinomában

<b>Klinikai vizsgálat</b>	<b>Szer neve</b>	<b>Fázis</b>	<b>Eredmény</b>	<b>Leállítás Éve</b>	<b>Megjegyzés</b>
NCT01149434 (K-Ras mutáns CRC)	Everolimus	Fázis II.	Leállították	2014	A szer nem bizonyult hatásosnak
NCT01637194 (Metastatikus vagy recidív CRC)	Everolimus	Fázis I.	Befejeződött	2012	A effektív dózis nehezen tolerálható
NCT00390364 (Metastatikus CRC)	Everolimus	Fázis II.	Leállították	2014	A szer nem bizonyult hatásosnak
NCT01212627 (előre haladott CRC)	Ridaforolimus	Fázis I.	Leállították	2015	A vizsgálat támogatást megvonták
NCT01183663 (kombinációs kezelés)	Temsirolimus	Fázis I.	Befejeződött	2016	Maximálisan tolerálható dózis megállapítása
NCT02465060 (Előrehaladott stádiumú solid Tumorok)	MLN0128	Fázis II.	Aktív		Várhatóan 2022-re lesz vége
NCT01925274 (Metastatikus K-Ras és N-Ras CRC)	PF-05212384	Fázis II.	Leállították	2017	Kevés résztvevő miatt leállították
NCT00600496 (Előrehaladott stádiumú solid Tumorok)	AZD6244	Fázis I.	Aktív	2017.12.29.	Maximálisan tolerálható dózis megállapítása

## II. Célkitűzések

Az mTOR jelút aktivitás változásai hozzájárulnak a legkülönbözőbb daganatsejtek proliferációjához és túléléséhez. Munkámban az mTOR aktivitás változásokat, az mTORC1 és mTORC2 komplex aktivitás változásokkal összefüggő marker fehérjék mennyiségét vizsgáltam colon carcinomák klinikai mintáiban, illetve *in vitro* modellekben, az alábbi célokkal:

### II. 1. Humán klinikai colon carcinoma szövetmintákban:

- Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expressziójának *in situ* vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel;
- Az expressziós adatok és a betegek klinikai, túlélési adatai közötti összefüggések statisztikai elemzése.

### II. 2. Humán colon carcinoma sejtvonalakban:

- Az mTOR aktivitásának jellemzése;
- Az EGFR és mTOR inhibitor érzékenység, valamint az mTOR inhibitor kombinációs kezelések hatásának *in vitro* vizsgálata.



### III. Módszerek

#### III.1. Humán biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata

##### III.1.1. Biopsziás minták

103 colon carcinomás beteg szövettani biopsziás mintáját vizsgáltam. A felhasznált szöveti blokkok és a hozzá tartozó diagnózisok a Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében készültek 1996 és 2004 között. A betegek (50 nő és 53 férfi) műtét után 5-FU és oxaliplatin komplex kezelésben részesültek. Az betegek átlag életkora 62 év (median 63 év), 34 és 78 év között. A betegek klinikai adatainak vizsgálatakor a minimális betegkövetési idő 5 év, a túlélési adatok elemzésékor 10 év volt, 77 hónap median túlélés mellett. 72 esetben a tumorok a colonban, 31 esetben a rektumban jelentek meg. Az eseteket kliniko-patológiai jellemzőik szerint tovább csoportosítottuk. A tumor szövettani dedifferenciáltsága (Grade) szerinti osztályozás alapján 12 Grade I, 64 Grade II és 27 Grade III esetet vontuk be vizsgálatainkba. A pozitív nyirokcsomók megjelenésének prognosztikai jelentősége miatt a Dukes és a TNM klasszifikáció szerinti osztályozást is elvégeztük. Dukes klasszifikáció szerint az esetek megoszlása a következő - 30 esetben Dukes B2, 8 esetben Dukes C1, 56 esetben Dukes C2 és 9 betegnél Dukes D stádium. A nemzetközi TNM (International Union Against Cancer) csoportosítás szerint 36 beteget a II stádiumba, 60 beteget a III stádiumba és 7 beteget IV stádiumba soroltunk.

##### III.1.2. Szöveti multiblokk („tissue microarray”) módszer és immunhisztokémia

Az mTOR aktivitás szöveti szintű (*in situ*) meghatározásakor a jelátviteli fehérjék és foszfoproteinek mennyiségét a normál szöveti szintekhez viszonyítottuk. Szöveti multiblokk („tissue microarray” – TMA) metszeteken immunhisztokémiai reakciókat végeztünk. A formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetminták, hematoxin-eozinnal festett metszeteik alapján patológus (Micsik Tamás, Kopper László, Hajdu Melinda) által kijelölt reprezentatív területeiből 2 mm átmérőjű szöveti hengereket kiszűrve 4db 70 mintás TMA blokkot készítettünk. Esetenként legalább két, de több esetben három, vagy akár négy szövethenger is származott azonos blokkból, emellett „kontroll” normál colon, nyirokcsomó, máj, valamint orientációs és immunhisztokémiai pozitív-negatív kontroll szöveteket is elhelyeztünk a TMA blokkokban. A betegek

diagnosztikus célú biopsziás mintáinak további elemzéséhez Intézetünk etikai engedéllyel rendelkezik (TUKÉB no. 7/2006).

A biopsziás metszeteket deparaffináltuk, majd endogén peroxidáz blokkolást végeztünk (inkubáció 2,3 mg/ml perjódsvan 10 perc, 0,1 mg/ml Nátrium-borohidrid-oldatban 10 perc, majd 30 %-os hidrogén peroxid és metanol 1:9 arányú keverékében 20 perc). Ezután a metszeteken az antigénfeltárást, magas nyomású nedves hő kezelést végeztünk (kuktában 20-30 perc; 10mM-os pH=6 citrát pufferben vagy Dako pH6,1-es TRS pufferben). A metszeteket a nonspecifikus kötőhelyek blokkolására 3%-os lószérumban 30 percig inkubáltuk, majd az 5. táblázatban felsorolt ellenanyagokkal 4 °C-on, éjszakán át, vagy szobahőn 120 percig inkubáltuk. Az immunreakciókat TBST és PBS pufferes mosások közbeiktatásával Novolink (Novocastra) kittel detektáltuk, majd az peroxidáz aktivitást diaminobenzidin (DAB) kromogén és hidrogénperoxid szubsztát jelenlétében tettük láthatóvá, végül a sejtmagokat hematoxylinnel (2 perc) festettük meg.

**5. táblázat.** A primer antitestek specifikációja, és alkalmazásuk körülményei az elvégzett immunreakciókban

<b>Detectált Protein</b>	<b>mTOR</b>	<b>p-mTOR</b>	<b>Raptor</b>	<b>Rictor</b>	<b>p-S6</b>	<b>p-4EBP1</b>	<b>p-AMPK</b>
Gyártó	CST #2983	CST #2976	Nov #110-57455	Bethyl #00429	CST #2211	CST #2855	CST #2535
Hígítás	1:150	1:100	1:150	1:500	1:150	1:500	1:100
Feltárás	TRS	Citrát pH=6	TRS	Citrát pH=6	Citrát pH=6	TRS	Citrát pH=6
Inkubálás	4°C-on, éjszakán át	4°C-on, éjszakán át	Szobahő 120 perc	4°C-on, éjszakán át	4°C-on, éjszakán át	4°C-on, éjszakán át	4°C-on, éjszakán át

(CST-Cell Signaling Technology; Nov – Novus; Bethyl – Bethyl Laboratories).

Az immunreakciók értékelését 3 független személy végezte (2 patológus + disszertáció szerzője egy patológus segítségével) előre meghatározott elvek alapján. Eltérés esetén a egy harmadik patológussal konzultálva alakítottuk ki a végleges,

konszenzus értékeket. Az intenzitás alapján négy kategóriát határoztunk meg (negatív, 1+ (gyengén)/ 2+ (közepesen)/ 3+ (erősen) pozitív). Pozitívnak tekintettük a reakciót, ha a tumor sejtek legalább 10%-a mutatta a meghatározott erősségű reakciót az adott mTOR jelúthoz vagy annak aktivitásához kapcsolódó antitesttel. Ha a p-mTOR IHC 2+ vagy 3+ erősségű volt, akkor az esetet magas mTOR aktivitásúnak értékeltük. Ha az adott esetben az p-mTOR értékelés negatív volt vagy csupán gyenge (1+) reakciót adott, akkor az esetet alacsony mTOR aktivitásúnak ítéltük. A két komplex mennyiségére utaló Raptor és Rictor festések esetében Rictor/Raptor dominanciát az immunfestés intenzitás alapján állapítottuk meg. Ahhoz, hogy Rictor vagy Raptor mennyiségét dominánsnak határozzuk meg legalább egy kereszt intenzitásbeli különbséget kellett valamennyi értékelőnek megadnia. A TMA értékeléséhez 3DHistech Panoramic Viewer Programot és a Nikon E200 mikroszkópot használtuk.

### **III.1.3. Statisztika**

A túlélési adatok és az mTOR aktivitás különbségek összefüggését Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk, a számoláshoz a PAST ingyenes software-t használtuk (<http://folk.uio.no>). Multivariancia analízist is végeztünk a különböző faktorokat Cox regressziós modellel, az SPSS program csomag alkalmazásával (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). A csoportok közötti különbségeket  $\chi^2$  próba és Pearson-féle teszt segítségével is megvizsgáltuk. Statisztikailag szignifikáns különbségnek a  $p < 0.05$ -t tekintettük.

## **III.2. *In vitro* vizsgálatok humán colon carcinoma sejtvonalakkal**

### **III.2.1. *In vitro* sejtvonalak**

A vizsgálatunkhoz eltérő genetikai háttérrel (mutációs profillal) rendelkező humán colon carcinoma sejtvonalakat választottunk (6. táblázat). Az eredtileg az ATCC (American Type Culture Collection) vagy az ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) nemzetközi szövetbankokból beszerzett sejtvonalakat Intézetünk sejtbankjából használtuk. A sejtvonalakat igényeiknek megfelelően RPMI 1640, DMEM, ill. MEM tápoldatban tenyésztettük, kiegészítve 10% FCS-el (Gibco), 100 U/ml penicillin-el és 100 ng/ml streptomycin-el (Sigma).

A sejteket 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett tenyésztettük. A vizsgálatoknak megfelelően tenyésztőedényekben (25 vagy 75 mm<sup>2</sup>) vagy 6, 24, 48 és 96 lyukú lemezekben (tenyésztés idő, feldolgozási-technika sejtszám igénye és a sejtkultúra növekedési tulajdonságai) 5-10.000 sejt/100 µl vagy 200-300.000 sejt/ml sejtszámmal dolgoztunk. A sejteket passzáláskor vagy mérésekkor szükség szerint Tripszin EDTA oldattal inkubáltuk (0,05% trypsin és 0,02% EDTA - 5-10 percig) majd steril PBS-ben centrifugálva mostuk (1.000 RPM 10 perc), hogy a sejtek műanyaghoz, illetve egymáshoz tapadását megszüntessük.

**6. táblázat.** A felhasznált humán colon carcinoma sejtvonalak ismert mutációi

	SW620	SW480	HCT116	RKO	Colo205	GC3	CaCo2	HT29
mKRAS	+	+	+					
mBRAF				+	+			
mPI3KCa			+	+				+
mp53		+				+	+	+

### III.2.2. *In vitro* kezelések

A sejtek terápiás érzékenységét 24-72 órás kezelésekben vizsgáltuk, cetuximab (10 µg/ml, Erbitux Bristol-Myers,), gefitinib (1-20 µM, Cayman Chemical), cisplatin (0.1 - 10 µg/ml, EBEWE Pharma), rapamycin (50 ng/ml, Sigma), PP242 (25 mM - ATP-kompetitív inhibitor, gátolja az mTOR kinase aktivitását az mTORC1 és az mTORC2 komplexben is, Tocris Bioscience), NVP-BEZ235 (0.01-1 µM - dual ATP-kompetitív PI3K és mTOR inhibitor, Cayman Chemical) kezeléseket végezve. A törzsoldatoknak megfelelően a kontroll kezelésekhez, az éles kezeléskor a tenyészetekbe kerülő maximális oldószer (pl. DMSO 5%) koncentrációkat alkalmaztuk. A rapamycin kezelést bomlása miatt naponta ismételtük.

### III.2.3. A proliferáció és apoptózis vizsgálatok *in vitro*

A sejtek proliferációs változásait kezelések hatására a sejtszám változás meghatározása mellett Alamar Blue proliferációs teszttel is vizsgáltuk. 1.500-5.000 sejt/100 µl kezdeti sejtszámmal dolgoztunk, majd 20-44 és 68 órával a kezelés megkezdése után 10 µl AlamarBlue® (resazurin, ThermoFisher) oldatot adtunk 100 µl-

enként a platekhez, majd a sejteket termosztátban 4 órát inkubáltuk. Az élő, metabolikusan aktív sejtek mennyiségével arányosan a hozzáadott festék fluoreszcens resofurinná redukálódik, ennek abszorbanciáját spektrofotométerrel 570 és 590 nm között detektáltuk (Ascent szoftver, Fluoroskan Ascent FL, Labsystems), végül a proliferáció mértékét a kezeletlen kontrolban mért értékek százalékában adtuk meg.

Az apoptózis mérésére áramlási citometriát alkalmaztunk. A vizsgálat során a sejteket először 70%-os etanolban (-20 °C-os etanol, 20 perc; majd lehetséges tárolás -20 °C-on) fixáltuk, ezt követte centrifugálási lépéseket követően az alkalikus extrakció (200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) és az RNáz kezelés (Sigma), végül festés propidium-joddal (1 mg/ml, Sigma). A mérést FACScalibur (BD Biosciences) készülékkel végeztük, Cell Quest software segítségével (BD Sciences – 10-20.000 esemény/minta). Az így kapott eredményeket Winlist software-el (Verity Software House) értékeltük. Apoptotikusnak tekintettük az alacsony DNS tartalmú, úgynevezett szubG1 sejteket.

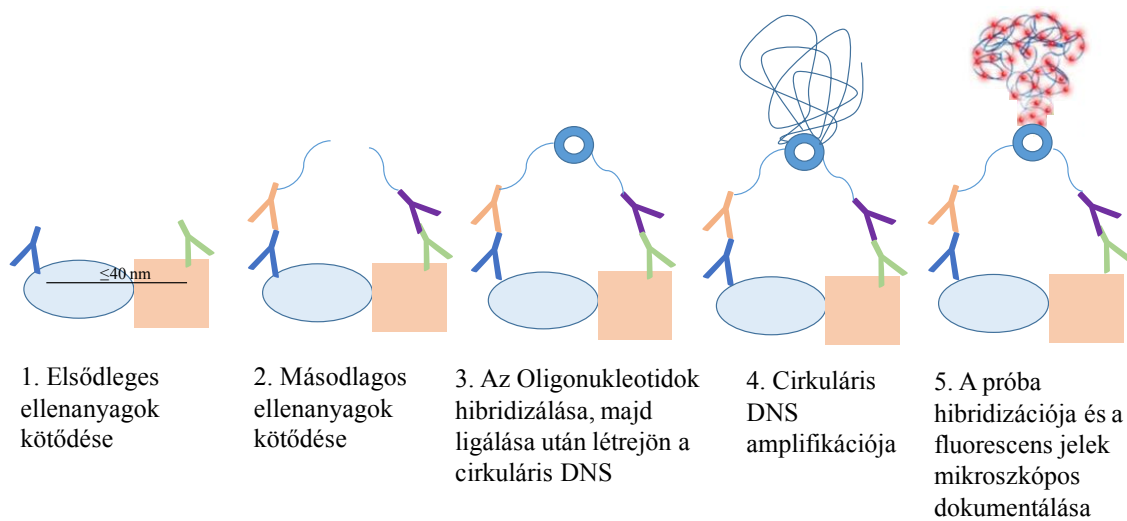
#### **III.2.4. Fehérjék expresszió vizsgálata – Immuncitokémia, Western blot, és Duolink festés**

Az *in vitro* sejtvonalak mTOR aktivitásának jellemzéséhez a fehérjék mennyiségének vizsgálatát többféle módszerrel végeztük. A humán biopsziás mintákhoz hasonló immunfestéseket végeztünk a sejtvonalak sejtjeiből készített cytospin lemezeken. A sejteket Tripszin-EDTA kezelést követően PBS-el mostuk majd 5 percig 500 rpm-el cytocentrifugáltuk SuperFrost Plus tárgylemezekre. Ezután metanollal (-20°C, 80%) fixáltuk és endogén peroxidase blokkolást végeztünk a korábban leírt perjódsvas és Na-borohidrides módszerrel. Az immunhisztokémiai festéshez hasonlóan ezt követte a lószérumos blokkolás majd az elsődleges antitest (Rictor, p-mTOR, Raptor, az ellenanyagok és hígításuk megegyezett az immunhisztokémia során alkalmazottal (lásd 5. táblázat) inkubáció szobahőmérsékleten 2 órán keresztül és a Novolink Polymer előhívás DAB kromogénnel (Novocastra), illetve a haematoxylin háttérfestés. Az immuncitokémiai lemezeket két patológus is értékelte a korábbiakhoz hasonlóan.

Egyes kezelt és kezeletlen sejtvonalakon a fehérjeszintek kvantitatív összehasonlítását Western blot módszerrel is elvégeztük. A sejteket SDS mintapufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP40; 1 mM PMSF; 10 mM NaF; 0,5 mM nátrium-vanadát; 10 mM proteináz koktél (Sigma) és 10% glicerol) lizáltuk, jégen inkubáltuk majd a fehérje lizátumot sejtörmeléktől mentesítettük (centrifugálás 2000

rpm, 15 percig). Az extarktum fehérje tartalmát Quant-iT Protein Assayel (Invitrogen) határoztuk meg. SDS-PAGE gélelektroforézisen 20 µg összfehérjét futtattunk, majd a mintákat PVDF membránra blottoltuk. Tejporos (5%) blokolást követően a membránt a megfelelő antitestekkel inkubáltuk (foszforilált-p70S6K –p-p70S6K, p-S6, Rictor, p-mTOR ellenanyagok Cell Signaling Technologies #9234, #2211, #2140, #2972; Raptor és Rictor ellenanyagok Novus Biotechnologies #89603 illetve a Bethyl #00429), majd biotinilált másodlagos antitest és avidin-HRP complex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector) inkubáció következett chemiluminescens előhívással (Pierce ECL Western Blotting Substrate), KODAK Image Station alkalmazásával. A membránokat vetköztetés után (Re-Blot Plus, Millipore) az azonos mennyiségű fehérje mennyiség és az összehasonlíthatóság igazolásához β-actin (A2228, Sigma) ellenanyaggal és HRP konjugált másodlagos ellenanyaggal (Vector) is előhívtuk.

Duolink festést - fehérje-fehérje komplexek és fehérjemódosulások kvantitatív kimutatására alkalmas technika - használtunk a foszforilált S6 fehérje illetve az mTOR-Rictor fehérje komplex detektálására és mennyiségének meghatározására bizonyos sejtvonalak esetében. Duolink festésekhez a cytospin lemezeket paraformaldehiddel (10 perc, 4%) fixáltuk, majd permeabilizáltuk (TritonX-100 0,4%). A lószérumos blokkolás után a lemezeket az adott elsődleges ellenanyag párokkal (egér anti-S6, 1:100 és nyúl anti-p-S6, 1:100 - Cell Signaling; illetve egér anti-Rictor, 1:500 - Bethyl Lab. és nyúl anti-mTOR, 1:500) szobahőn 30 percig inkubáltuk. A mosási lépéseket követően oligonukleotiddal kapcsolt másodlagos ellenanyagokat adtunk a lemezekhez, majd a ligációs (másodlagos ellenanyagpárok oligonukleotidjai csak akkor tudnak kapcsolódni, ha 40nM-en belül kötődött a két másodlagos ellenanyag – meghatározott távolságban vannak az adott antigének) és cirkuláris amplifikációs lépéseket követően („rolling circle” amplifikáció 37°C-on, 90 perc, megsokszorozza az adott ligált fragmenteket) a fluoreszcensen jelölt nukleotid próbákat hibridizáltuk a megfelelő fragmentekhez. Ez a vizsgált fehérje komplexek illetve foszforilált fehérjék (Rictor-mTOR, pS6) jelenlétét pontszerű jelként mutatta meg fluoreszcens mikroszkópban. A sejtmagokat DAPI-val festettük, majd a fluoreszcens felvételeken BlobFinder program segítségével határoztuk meg a sejtenkénti reakciók számát, ami kvantitatív értékelést tesz lehetővé a minták esetében (10. ábra).



**10. ábra.** A Duolink festés elve. Az elsődleges ellenanyagok kötődnek az antigénekhez, majd az oligonukleotid szekvenciával konjugált másodlagos ellenanyagok és hozzákötnek a megfelelő primer ellenanyagokhoz. Ha a kimutatandó két fehérje 40 nm-en belül helyezkednek el vagy a fehérje módosulás jelen van (pl. a fehérje és foszforilált motívuma), akkor a másodlagos ellenanyagok oligonukleotidjai egymással hibridizálni képesek. Ezt követi a szekvenciák ligálása, majd a cirkuláris amplifikáció, és végül a megsokszorozott DNS-hez a fluoreszcensen jelölt nukleotid próbák hibridizálása, amit detektálhatóvá teszi fluoreszcens mikroszkópban a megfelelő szignálokat, az adott fehérje-fehérje komplexeket vagy pl. foszfo-proteineket.

### III.2.5. *In vitro* vizsgálatok statisztikai értékelése

Az adott kezelések után a proliferációs változások átlagértékeiket és az SD értékeket minimum három független párhuzamosból, és lehetőség szerint három vagy több párhuzamos kísérletből számoltuk, a használt vizsgálati módszerektől függően. A Student's t-test és az egyirányú variancia analízist (ANOVA) használtunk. A  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## IV. Eredmények

### IV.1. Humán colon carcinoma biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata

#### IV.1.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok - humán colon carcinomák mTORC1 és mTORC2 komplexek aktivitás különbségei

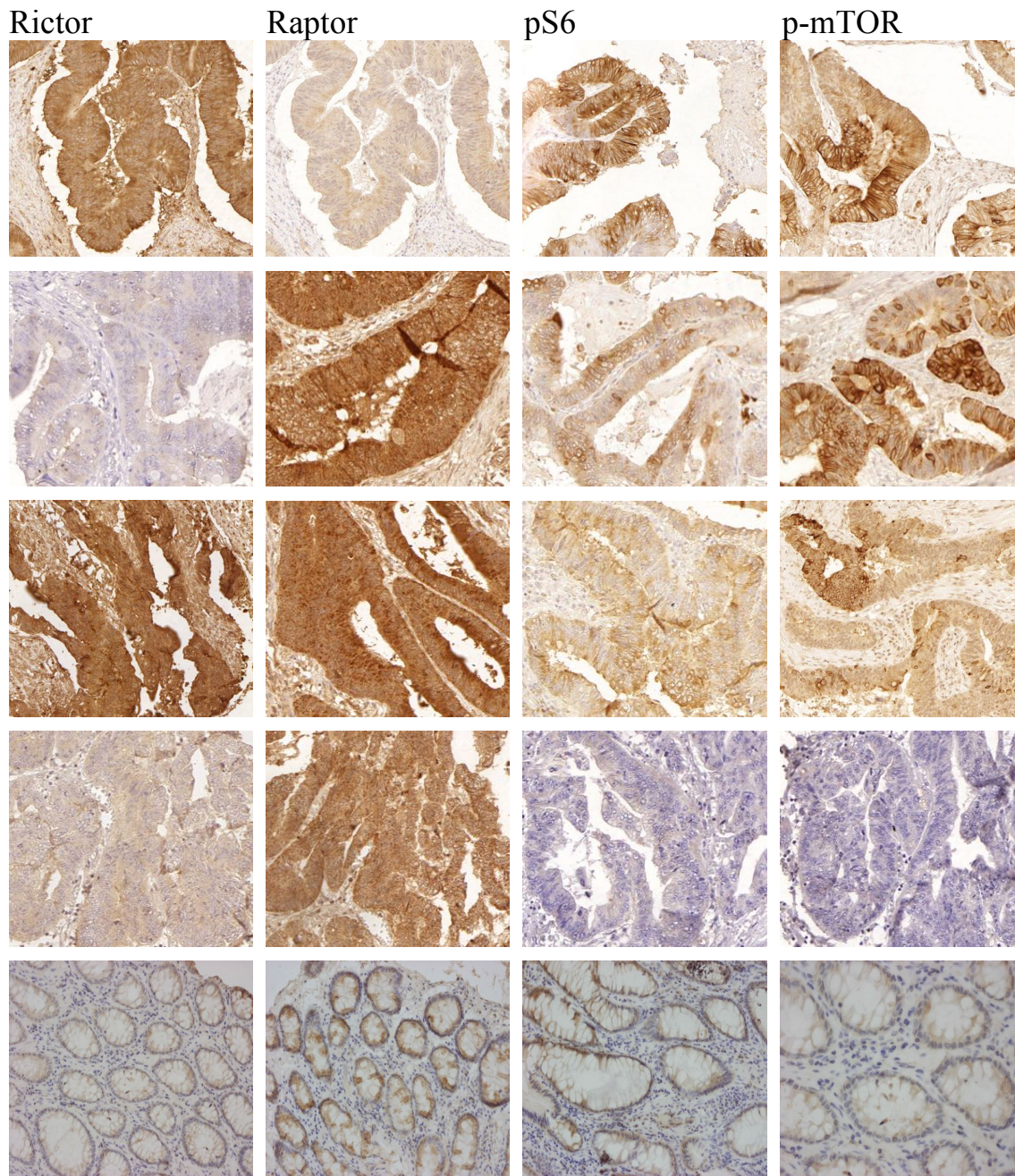
103 biopsziás minta TMA metszetein készült mTOR, p-mTOR, p-S6, p-4EBP1, p-AMPK, Rictor és Raptor immunhisztokémiai reakció, melyek független értékeléseit összegeztük. A p-mTOR festések 76 esetben (73,8%) magas mTOR (++ vagy +++ pozitivitás) aktivitást mutattak (11. ábra; 7. táblázat).

A 4EBP-1 és a p70S6K jól ismert mTOR kináz target molekulák, a fehérjék foszforilációja az mTORC1 komplex aktivitásának jele. A legérzékenyebb és legmegbízhatóbb mTOR, mTORC1 aktivitás markernek azonban a legtöbb vizsgálatban a p70S6K targetjének, a riboszómális S6 fehérje foszforilált formájának megjelenését (p-S6), immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatható p-S6 pozitivitást tartják a legkülönbözőbb humán szövetekben és biopsziás mintákban végzett vizsgálatok alapján. A p-S6, p-4EBP1 és a p-mTOR panel immunhisztokémiai értékeit minden esetben együttesen vizsgáltuk. Összességében a 76 intenzív p-mTOR expressziót mutató, magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetből 74 esetben találtunk 2+/3+ pozitivitással értékelt p-S6 festődést és ehhez hasonló eredményeket mutatott a p-4EBP1 immunhisztokémiai reakció értékelése is. Három olyan magas mTOR aktivitást mutató eset volt, amelyekben p-4EBP1 negatív festést tapasztaltunk, ennek ellenére az esetekben a p-S6 és p-mTOR festések 2+/3+ értékelést kaptak az összes patológus elemzésében. Két olyan eset volt a p-mTOR festés alapján magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetek között, amelyekben sem az S6, sem a 4EBP1 fehérje foszforilált formáit nem tudtuk kimutatni. Az alacsony mTOR aktivitású esetekben (27/103 eset) (26,2%), az egymással jó korrelációt mutató p-S6 és a p-mTOR immunreakciók negatív vagy + értékelése is egyértelműen alacsony mTOR aktivitásra utalt.

Az AMPK negatívan befolyásolja az mTOR aktivitást, amit az immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei is alátámasztottak; az összes alacsony mTOR aktivitású esetben kimutatható volt a p-AMPK pozitivitás (a kináz aktív formája), míg a magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetekben p-AMPK pozitivitást csak egy esetben tudtuk kimutatni.



Az mTOR kináz és az mTORC1 komplex aktivitását jellemző fehérjék mellett a két komplexben karakterisztikusan megjelenő – a Raptor-mTORC1 és Rictor-mTORC2 – fehérjék expresszióját is tanulmányoztuk immunhisztokémiával. A párhuzamos Raptor és Rictor festések alapján a vizsgált mintákat 3 csoportra tudtuk osztani: a. Rictor domináns expressziót mutató tumor sejtek – azok, amelyeknél a Raptor fehérje alig volt kimutatható (nagyon gyenge Raptor festés) és lényegesen intenzívebb Rictor festést tapasztaltunk (n=51, 49,5%); b. Raptor domináns expressziót mutató tumor sejtek - azok az esetek, amelyek tumor sejtjeiben Rictor nem vagy alacsony expressziót mutatott (n=14, 13,6%) és mellette jellegzetes Raptor festődést tapasztaltunk; c. Kiegyensúlyozott Rictor és Raptor expressziót mutató tumorsejtek - amelyekben hasonló intenzitású Rictor és Raptor festődést, fehérje expressziót detektáltunk (n=38, 36,9%). Abban a két esetben, ahol magas p-mTOR expressziót figyeltünk meg az mTORC1 aktivitásra jellemző markerek expressziójának hiányában (alacsony p-S6 és nem kimutatható p-4EBP1), egyértelmű mTORC2 komplexre jellemző Rictor dominancia volt megfigyelhető. A magas mTOR aktivitású 76 esetből 39 mutatott Rictor dominanciát, 8 volt Raptor domináns, míg összesen 29 esetben figyeltünk meg hasonló szintű Rictort és Raptort expressziót (11. ábra).



**11. ábra.** Fehérje expressziós mintázatok eltérő mTOR aktivitású humán colon carcinoma biopsziákban. I. csoport (legfelső sor): magas mTOR aktivitás, domináns Rictor expresszióval, ami jellemző az mTORC2 aktivitásra (39 beteg); II. csoport (felülről a 2. sor): magas mTOR aktivitás, domináns Raptor expresszióval, az mTORC1 komplex aktivitásra jellemző (8 beteg); III. csoport (felülről a 3. sor): magas mTOR aktivitás kiegyensúlyozott Raptor Rictor expresszióval (29 beteg); IV. csoport (felülről a 4. sor): alacsony mTOR aktivitás (27 beteg); normál colon szövettani minták (a legutolsó sor). Az ábrán minden kép 400x nagyítással, az utolsó sorban az első 3 kép 200x nagyítással készült.

**7. táblázat.** Az mTOR aktivitás, Rictor, ill. Raptor expresszió és az 5 éves túlélési adatok összefüggései.

	<b>Teljes esetszám</b>	<b>mTOR magas aktivitás</b>	<b>mTOR alacsony aktivitás</b>
<b>Összes esetszám</b>	100 (100%)	76 (73.8%)	27 (26.2%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	56 (54.4%)	35 (46.1%)	21 (77.8%)
<b>Rictor domináns expresszió</b>	51 (49.5%)	39 (76.5%)	12 (23.5%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	23 (45.1%)	16 (41.0%)	7 (58.3%)
<b>Raptor domináns expresszió</b>	14 (13.6%)	8 (57.1%)	6 (42.9%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	11 (78.6%)	5 (62.5%)	6 (100%)
<b>Nincs dominancia</b>	38 (36.9%)	29 (76.3%)	9 (23.7%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	22 (57.9%)	14 (48.3%)	8 (88.9%)

#### IV.1.2. mTOR aktivitás összefüggése a betegek klinikai adataival, hosszútávú túlélésével

Statisztikai módszerekkel a magas vagy alacsony mTOR aktivitás, a két komplex mennyiségének különbségei és a betegek neme, életkora vagy a diagnóziskor megadható stádiuma (Dukes) között szignifikáns összefüggéseket nem tudtunk kimutatni (8. táblázat). A betegek túlélési esélyei viszont szignifikáns összefüggést mutattak az alacsony mTOR aktivitással. Az alacsony mTOR aktivitású biopsziás mintákhoz tartozó betegcsoportban az 5 éves túlélés 77,8% volt (overall survival = OVS), míg a magas mTOR aktivitású csoportban, szignifikánsan rosszabb, 46,1% (7. táblázat és 12. a. ábra). A legjobb túlélési adatokat abban a betegcsoportban figyeltük meg, ahol az alacsony mTOR aktivitás mellett domináns Raptor expressziót, tehát alacsony mTORC1 aktivitást mutattunk ki. Ebben a csoportban mindenki a diagnózis után a kezelést követően 5 évnél hosszabb ideig élt (7. táblázat, 13. a. ábra). A két lényegesen rosszabb prognózisú csoportban - magas mTOR aktivitású és Rictort dominánsan expresszáló illetve a magas mTOR aktivitású dominanciát nem mutató csoport között - számottevő különbséget az 5

éves túlélési adatokban (5 éves OVS 41%, 48,3%) nem tudtunk kimutatni (14. ábra). Előbbiek alapján a túlélési eredmények azoknak a betegeknek az esetében a legrosszabbak, akik biopsziás mintáiban magas mTOR aktivitás mellett Rictort is nagy mennyiségben expresszáltak, tehát a mintákban magas mTORC2 aktivitású tumorsejtek találhatók. A magas mTOR aktivitású, Raptort dominánsan expresszáló csoport túlélési adatai szignifikánsan jobbak voltak, mint más magas mTORC2 komplex expressziót mutató tumoros eseteké. Ezeknek a betegeknek az 5 éves túlélése csak az alacsony mTOR aktivitású és mTORC2 komplex domináns expressziót nem mutató esetekénél volt rosszabb (5 éves OVS 62,5%) (7. táblázat, 12., 13 és 14. ábra).

**8. táblázat.** mTOR aktivitás megoszlása a Dukes stádiumok szerint a vizsgált colorectális carcinomákban

	mTOR magas			mTOR alacsony		
Dukes	Rictor	Raptor	Rictor=Raptor	Rictor	Raptor	Rictor=Raptor
B2 (33 Eset)	24 eset (72.7%)			9 eset (27.3%) eset		
	13 eset (39.4%)	3 eset (9.1%)	8 eset (24.3%)	4 eset (12.1%)	1 eset (3%)	4 eset (12.1%)
C1 (10 Eset)	3 eset (30%)			7 eset (70%)		
	3 eset (30%)	0	0	6 eset (60%)	0	1 eset (10%)
C2 (51 Eset)	43 eset (84.3%)			8 eset (15.7%)		
	21 eset (41.2%)	5 eset (9.8%)	17 eset (33.3%)	1 eset (1.9%)	4 eset (7.9%)	3 eset (5.9%)
D (9 Eset)	6 eset (66.7%)			3 eset (33.3%)		
	2 eset (22,2%)	0	4 eset (44.5%)	1 eset (11.1%)	1 eset (11.1%)	1 eset (11.1%)

Megvizsgáltuk a túlélési adatokat csak az mTOR komplexek mennyiségét mutató Raptor és Rictor expresszióval összefüggésben is. A Rictor expresszió, még az mTOR aktivitás (p-mTOR festés értékelése) értékektől függetlenül is mutatott összefüggést a

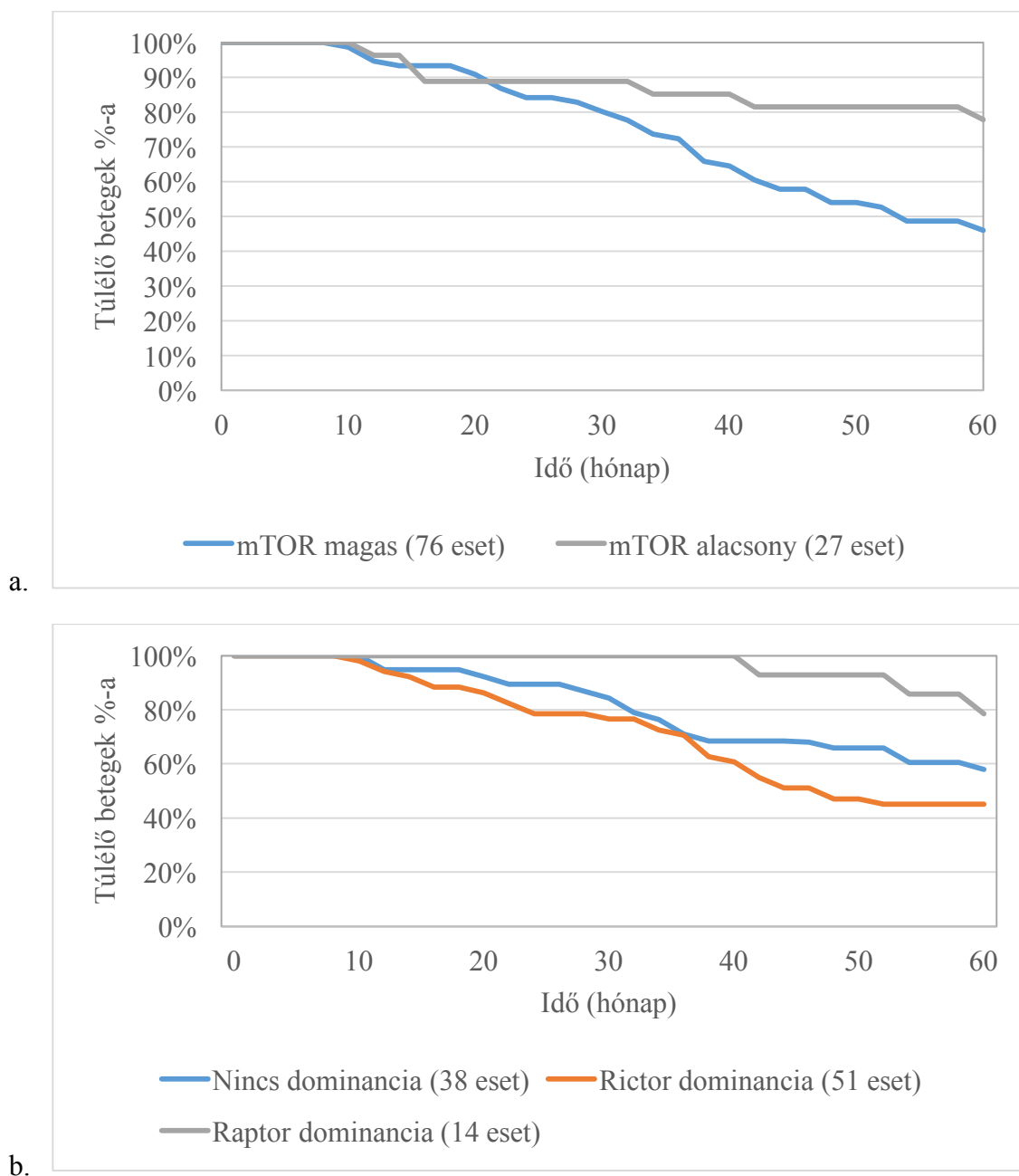
betegség progressziójával. A legrosszabb túlélési adatokat (5 éves túlélés 49,5%) a Rictort dominánsan kifejező tumorsejtek jelenlétével jellemezhető szövetmintákhoz tartozó betegcsoportban tapasztaltunk abban az esetben, ha csak három csoportot hasonlítottunk össze (Raptor domináns, Rictor domináns és kiegyensúlyozott komplex expresszió) (13.b. ábra).

Az adatok alapján elkészített Kaplan-Meier görbék is jól mutatják a tumorszövetben jellemző magas mTOR aktivitás és a hozzá kapcsolódó magas Rictor expresszió (Rictor domináns expresszió vagy kiegyensúlyozott Rictor és Raptor expresszió) esetében az mTORC2 komplex aktivitás és rövidebb túlélési idő közötti korrelációt (12. és 13. ábra). Cox regressziós analízis (figyelembe véve olyan változókat, mint az életkor, nem, stádium) szignifikancia adatai igazolták, hogy a magas mTOR aktivitás és a magas Rictor expresszió (domináns vagy kiegyensúlyozott Rictor expresszió) független és a Dukes stádium meghatározásnál erősebb rizikó faktorok, jelezhetik a rossz prognózist. A kimutatott magas mTOR aktivitás vagy Rictor expresszió a többi faktortól függetlenül emelte a relatív kockázatát a rövidebb túlélésnek (Relative Risk of mTOR activity=2,62 (1,2-5,95) p=0,02; Relative Risk of high Rictor expression=2,518 (0,89-7,094) p=0,081), rossz prognózisnak (9. táblázat).

**9. táblázat.** Cox regressziós analízis eredménye a vizsgált colorectális carcinomákban.

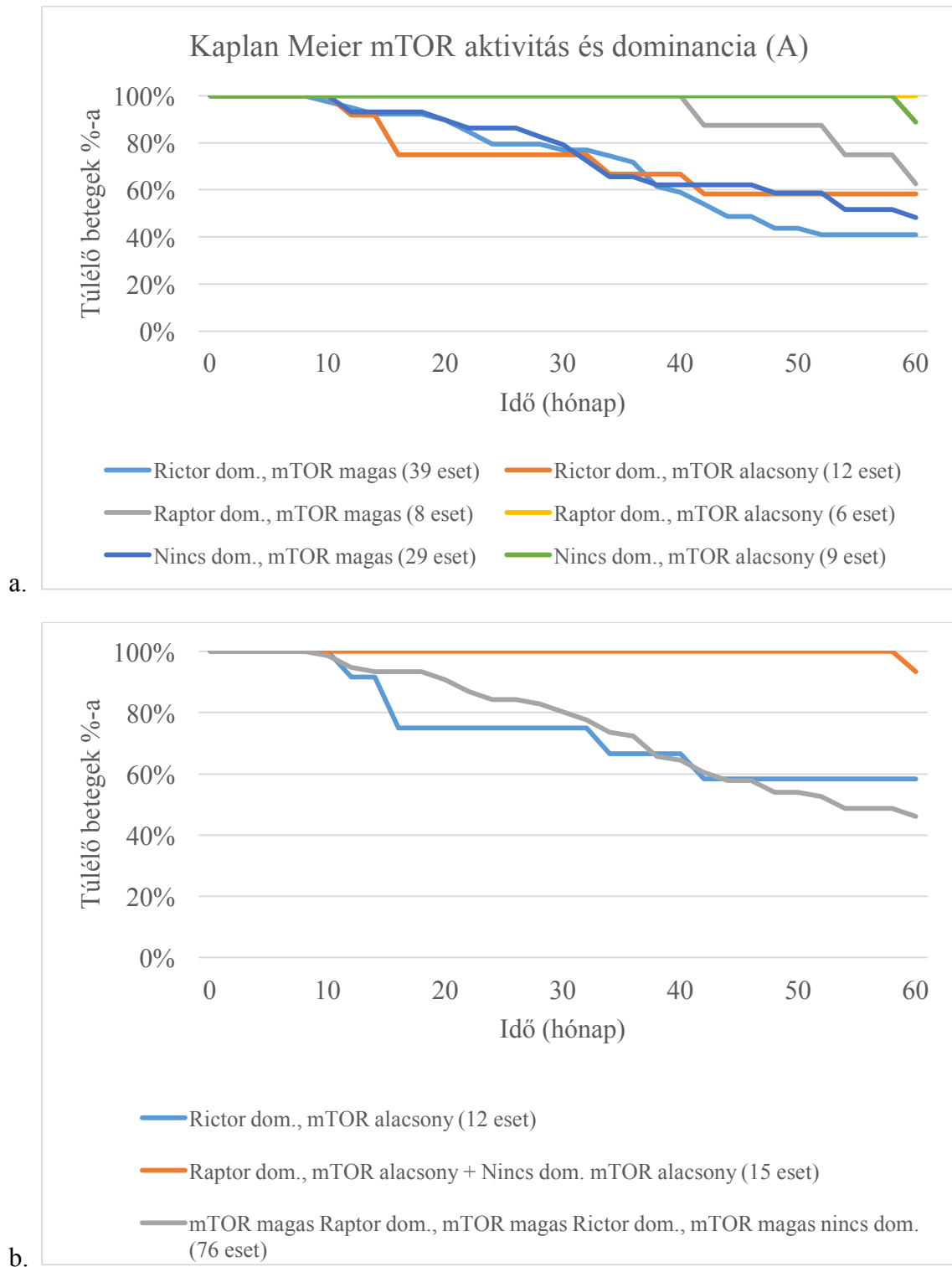
Dukes' stádium: B1 stádium vagy annál rosszabb (C1-C2-D). Magas Rictor expresszió: Rictor $\geq$ Raptor. HR - High Risk; HRa: adjusted High Risk (minden a táblázatban feltüntetett faktorról korrigált rizikószámítás)

	HR (95% CI) p érték	HRa (95% CI) p érték
magas mTOR aktivitás	2.952 (1.329 - 6.558) 0.008	2.577 (1.145 - 5.803) 0.022
magas Rictor expresszió	2.621 (0.994 - 7.274) 0.064	2.597 (0.923 - 7.311) 0.071
Dukes' stádium	2.132 (1.118 - 4.069) 0.022	2.153 (1.125 - 4.118) 0.021
életkor	0.996 (0.965 - 1.028) 0.796	1.007 (0.974 - 1.041) 0.701
nem	1.517 (0.872 - 2.641) 0.14	1.446 (0.823 - 2.541) 0.2

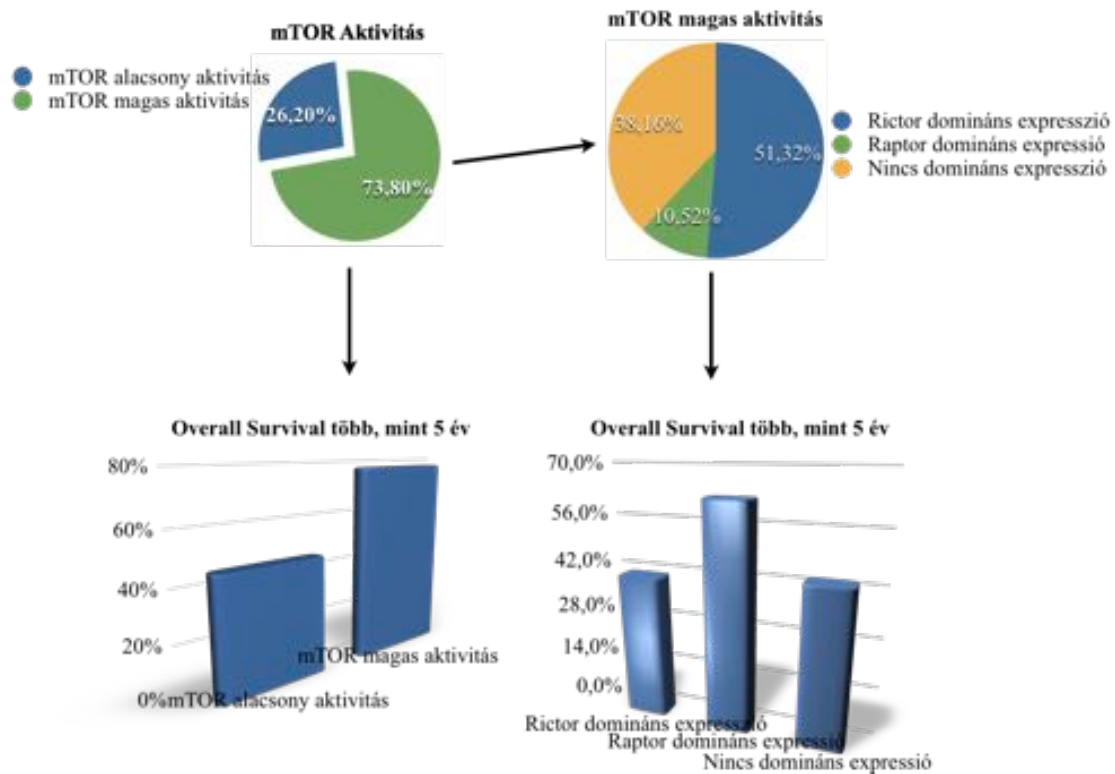


**12. ábra.** Colorectális carcinomák 5 éves túlélési adatai az mTOR aktivitás (a), illetve a Rictor és Raptor expresszió (b) függvényében.





**13. ábra.** Colorectális carcinomák 5 éves túlélési adatai az mTOR aktivitás és a két komplex kombinált meghatározásának függvényében (a), illetve a prognosztikai szempontból jelentős csoportok, mTORC1, ill. C2 aktivitások szerint (b). (dom – dominancia)



**14. ábra.** A szöveti mTOR aktivitások alapján megállapított betegcsoportok megoszlása és túlélési adatai

## IV.2. Humán colon carcinoma sejtvonalak *in vitro* vizsgálatának eredményei

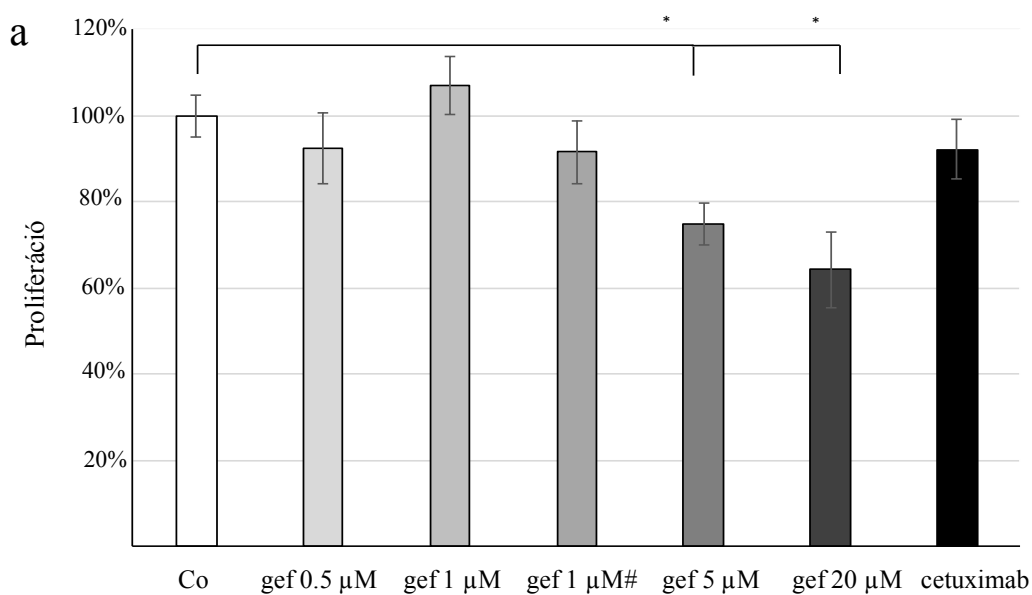
Munkám másik részében különböző humán vastagbél daganatokból származó *in vitro* sejtvonalakban vizsgáltam az mTOR gátlók illetve a rapamycin és EGFR inhibitor kombinált kezelés proliferáció gátló hatásait.

### IV.2.1. EGFR inhibitor rezisztencia kimutatása

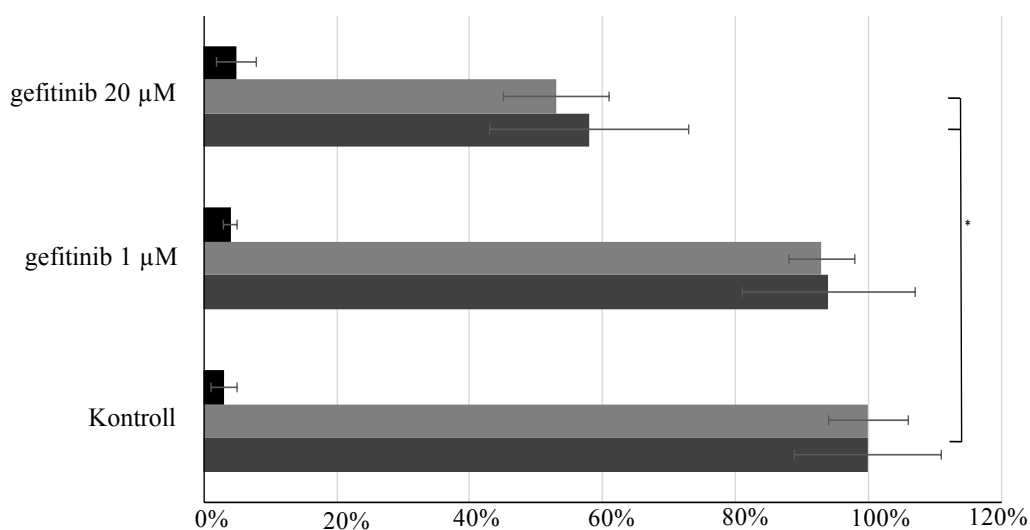
Intézetünk sejtvonal bankjában elérhető colon carcinoma sejtvonalak a módszer fejezetben bemutatott jellegzetes mutációinak (mKRAS – SW620, SW480, HCT116, mBRAF – RKO, Colo205, HT29; mPI3KCA – HCT116, RKO, HT29, mP53 – CaCo2, HT29, SW480, SW620, GC3) ismeretében feltételeztük, hogy ezek a sejtek sokféle kezeléssel, így EGFR gátlókkal szemben is rezisztensek lehetnek. *In vitro* kísérleteinkben sem a gefitinib, sem a cetuximab – más EGFR gátló szenzitív sejtek



esetében hatásos dózisa - nem gátolta a proliferációt vagy indukált apoptózist 72 h-ás inkubációt követően a vizsgált sejtvonalakban (15. ábra). A nagy dózisu gefitinib-kezelés – amely során már a nem specifikus kináz gátló hatások is érvényesülnek – azonban szinte minden sejtvonalban szignifikáns proliferáció gátló hatást és bizonyos sejtekben, például HT29 és GC3 esetében az apoptotikus sejtek arányának emelkedését mutatta. Legtöbbször azonban, az RKO sejtvonalhoz hasonlóan, a nagy dózisu gefitinib kezelésnek is csak proliferáció gátló hatása volt *in vitro* (10. táblázat).



b



■Flow citometriával detektált apoptózis ■proliferáció Alamar Blue tesztel ■proliferáció a sejtszám alapján

**15. ábra.** Cetuximab és Gefitinib hatásai *in vitro* RKO colon carcinoma sejtvonalban.

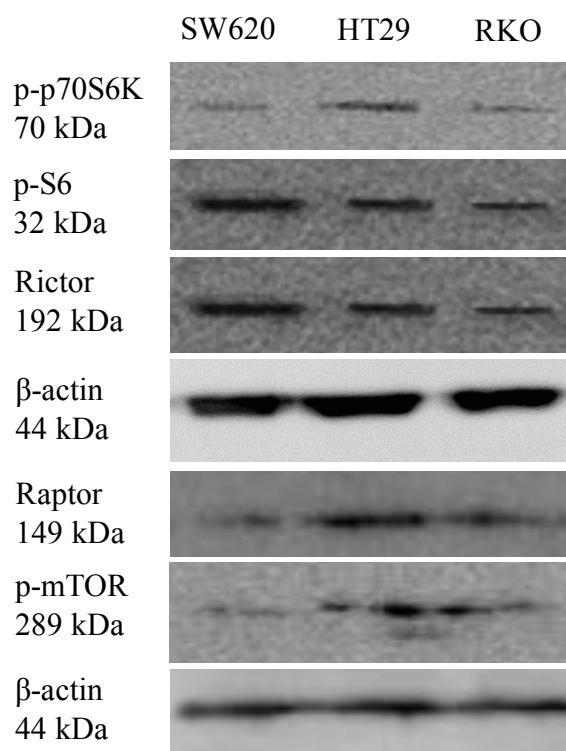
72 órás alacsony dózisú EGFR gátló kezelések (gefitinib, cetuximab) szignifikánsan nem befolyásolták sem a proliferációt (a.), sem az apoptózis mértékét (b.). ( $p^* < 0.05$ )

**10. táblázat.** Cetuximab és Gefitinib kezelések *in vitro* proliferációs hatásai a vizsgált colon carcinoma sejtvonalakban. 72 órás Alamar Blue teszt, ( $p^* < 0.05$ )

Proliferáció %-ban Alamar Blue Test vizsgálattal	RKO	Colo205	CaCo2	SW480	SW620	GC3	HT29	HCT 116
Cetuximab (10 µg/ml)	92%	89%	89%	97%	98%	100%	95%	87%
Gefitinib (0.5 µM)	97%	91%	87%	100%	95%	95%	98%	94%
Gefitinib (5 µM)	69%*	64%*	84%*	85%*	65%*	87%	79%*	90%

#### IV.2.2. Colon carcinoma sejtvonalak *in vitro* rapamycin érzékenysége és mTOR aktivitása

Fehérje expressziós vizsgálataink a humán colon carcinoma sejtvonalakban az *in situ* biopsziás mintákban kapott eredményeinkhez hasonlóan a vastagbél daganat sejtek magas mTOR aktivitását mutatták Western blot, immuncitokémia és Duolink módszerekkel is. A sejtvonalak egyedi expressziós különbségeket mutattak a Rictor és a Raptor mennyiségében és ennek megfelelően az mTORC2 komplex expresszió jellemzését, illetve az mTORC1 aktivitást jellemző Duolink festésekben is (16-17. ábra, 11. táblázat).

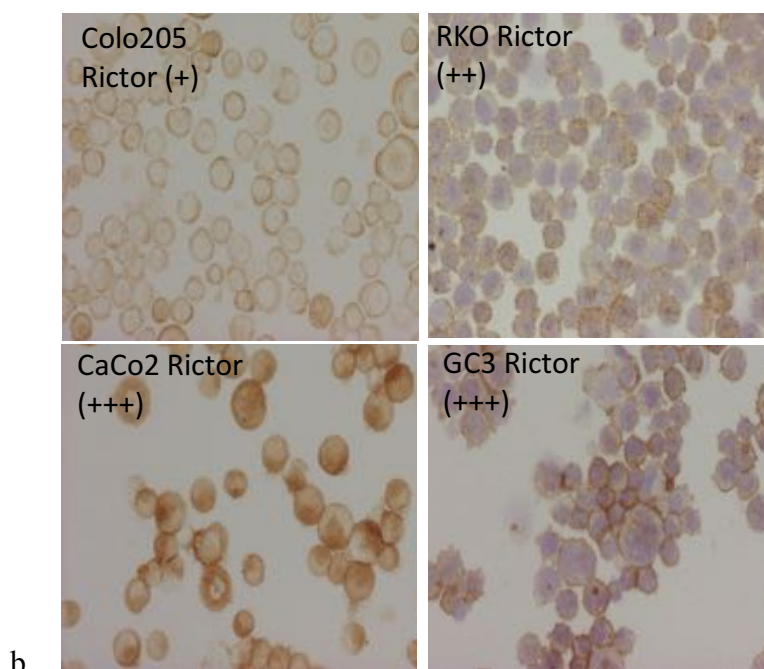
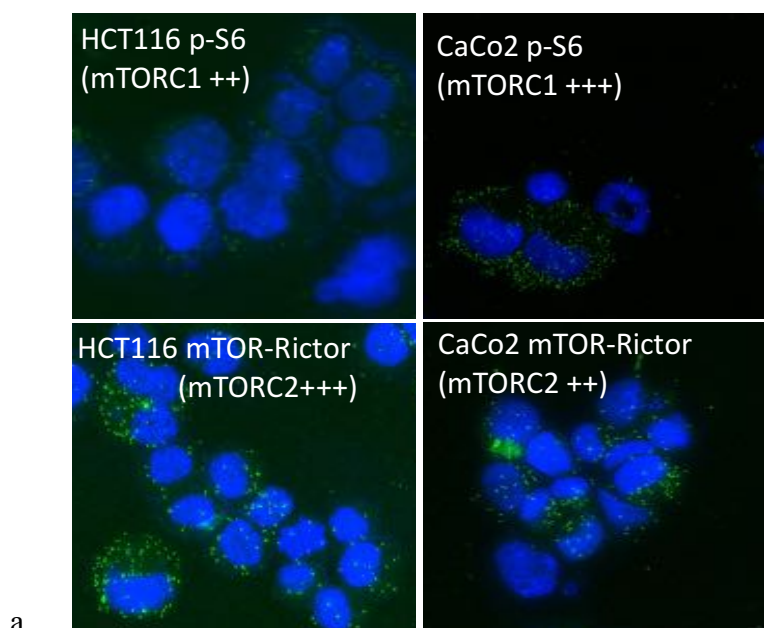


**16. ábra.** Karakterisztikus mTOR aktivitás különbségek SW620, HT29, RKO colon carcinoma sejtvonalakban Western blottal. A p-mTOR - aktív mTOR kináz, mTORC1 és C2 komplexben jellemző Raptor, ill. Rictor fehérjék és az mTORC1 direkt és indirekt target fehérjéinek - p-p70S6K és a p-S6 - mennyiségi vizsgálata.

**11. táblázat.** Colon carcinoma sejtvonalakban mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expressziójának jellemzése immuncitokémiai festések értékelése alapján

ICC	SW620	HT29	RKO	SW480	GC3	Colo205	HCT116	CaCo2
<b>p-S6</b>	++	+++	++	+	++	++	++	+++
<b>Rictor</b>	++	+++	++	+	+++	+	+++	+++
<b>Raptor</b>	+	++	+	+	++/+++	+	++	++

(+ alacsony; ++ közepes; +++ magas expresszió, 2 patológus független értékelése alapján)

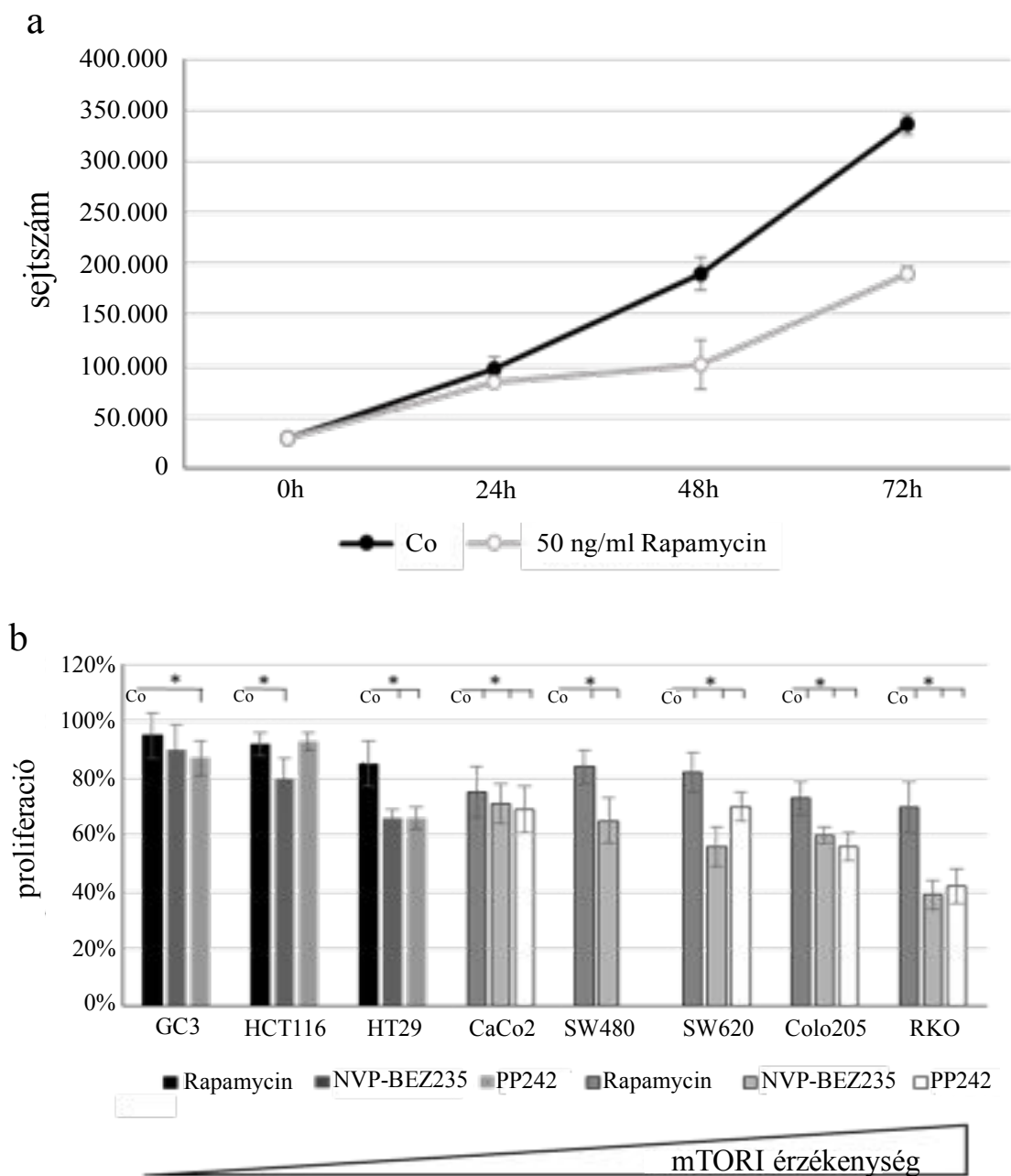


**17. ábra.** Karakterisztikus mTOR aktivitás különbségek humán colon carcinoma sejtekben

Duolink módszerrel végzett immuncitokémiai festések reprezentatív képei (a); A magas mTORC2 aktivitásnak megfelelően (mTOR-Rictor) nagyszámú fluoreszcens szignál látható a HCT116 sejtekben, míg a magas mTORC1 aktivitáshoz köthető p-S6-S6 kolokalizációs szignál a Caco2 sejtekben jelenik meg (400x).

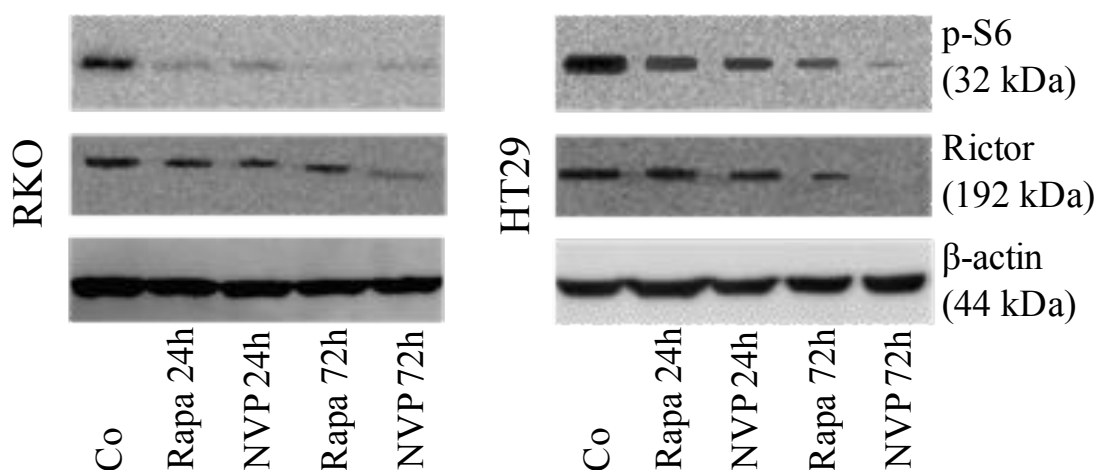
Néhány vizsgált sejtvonal reprezentatív Rictor immuncitokémiai reakciója (b) (DAB, barna), a jobb oldali ábrákon hematoxin magfestéssel (200x).

Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expressziója - az aktív mTOR-kináz (p-mTOR), az mTORC1 és C2 komplex jellegzetes Raptor vagy Rictor fehérjéje, az mTORC1 komplex aktivitással összefüggő p-p70S6K és a p-p70S6K célfehérjének, a foszforilált riboszomális S6 (p-S6 ) fehérjék – összefüggést mutatott a sejtek mTOR inhibitor érzékenységeivel (18. ábra). Az érzékenység különbségeket 72 órás rapamycin, és az mTORC1 és C2 komplexet is gátló PP242, valamint duál mTOR inhibitor (NVP-BEZ25) kezelésekkel igazoltuk. Megfigyeltük, hogy a Rictort nagy mennyiségben termelő (immuncitokémiával +++) sejtek, így a GC3, HCT116 és HT29, kevésbé érzékenyek az mTORC1 inhibitor kezelésre. Míg az alacsony Rictor (mTORC2 komplexre jellemző) expressziót mutató colon carcinoma sejtekben, a C1 és C2 komplexet is gátló szerek mellett a rapamycin is szignifikánsan gátolta a proliferációt az *in vitro* kísérletekben. A Rictor expressziót nem vagy alig mutató sejtekben, pl. az mTOR gátlókkal szemben legérzékenyebb RKO sejtekben a dual inhibitor és C1-C2 komplex gátló kezelések a rapamycin kezelésnél hatásosabbnak bizonyultak (18. ábra). Az RKO sejtekben az mTORC1 aktivitás markerének is tekintett p-S6 fehérje mennyisége rapamycin és NVP-BEZ235 kezelés hatására már 24h alatt lecsökkent, míg a kevésbé érzékeny HT29 sejtekben 72 órás NVP-BEZ235 kezelés tudta csak szignifikánsan csökkenteni a p-S6 mennyiségét. A p-S6 fehérje mennyiségét a rapamycin és az NVP-BEZ235 is csökkentette, míg az mTORC2 komplex Rictor fehérje mennyiségét szignifikánsan csak a dual inhibitor NVP-BEZ235 csökkentette (19. ábra).



**18. ábra.** Colon carcinoma sejtvonalak eltérő mTOR inhibitor érzékenysége *in vitro*, Alamar Blue teszt alapján.

Időfüggő szignifikáns proliferáció gátló hatás 50 ng/ml rapamycin kezelést követően RKO sejtvonalban (a.); 72h-ás kezelések proliferáció gátló hatása (50 ng/ml rapamycin, 1  $\mu$ M NVP-BEZ235 - mTOR and PI3K dual inhibitor - és 1  $\mu$ M PP242 - mTORC1 and C2 inhibitor) a kezeletlen kontrol sejtek proliferációjának százalékában (b) ( $p^* < 0.05$ ) \*.



**19. ábra.** A p-S6 és Rictor fehérjeszintek változása mTOR inhibitor kezelés hatására colon carcinoma sejtekben (Western blot eredmények).

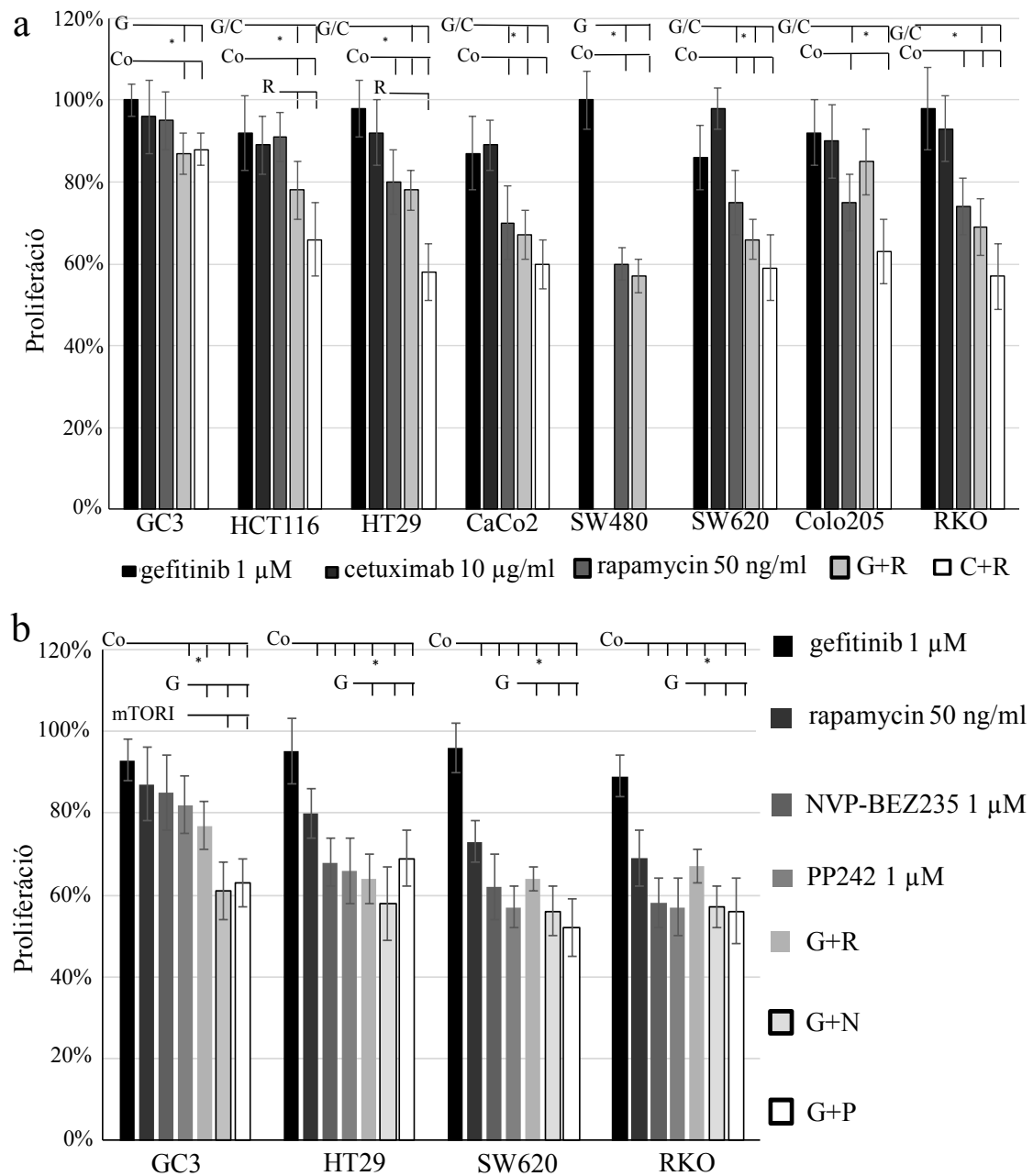
Az mTOR gátló rapamycin (50 ng/ml - Rapa) és NVP-BEZ235 (1  $\mu$ M – NVP) kezelés csökkentette az mTORC1 aktivitáshoz köthető foszforilált-S6 (p-S6) és Rictor (az mTORC2-re jellemző protein) szintjét RKO és HT29 sejtvonalakban.

#### **IV.2.3. mTOR inhibitor kombinált kezelés hatása humán colon carcinoma sejtekre *in vitro***

A rezisztencia egyre több célzott kezelés, így az EGFR inhibitorok (EGFRI) esetében is klinikai problémát jelent. Ezért EGFRI rezisztens colon carcinoma sejtvonalakban vizsgáltuk az EGFRI és rapamycin, illetve más mTOR inhibitor kombinációk *in vitro* proliferáció gátló hatásait, a kombinációs kezelések lehetséges szenzitizáló hatását. Kimutattuk, hogy a rapamycin és más mTOR inhibitorok (pl. NVP-BEZ235 és a PP242), valamint EGFR inhibitor kombinációk hatásos tumornövekedés gátlók lehetnek a legrezisztensebb vastagbél tumorsejtekben (GC3, HCT116 és HT29). Megfigyeltük azt is, hogy a proliferáció gátló hatás az mTOR inhibitor érzékeny sejtvonalakban szignifikánsan már nem fokozható az mTOR és az EGFR gátló kombinációval a rapamycin kezelés hatásaihoz képest (20. ábra).

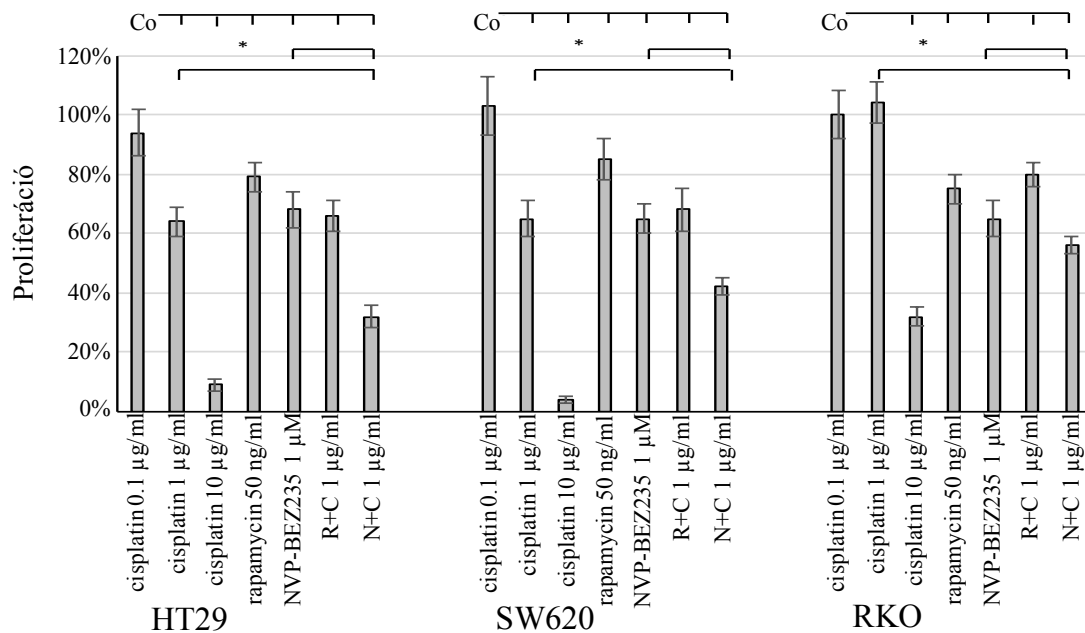
Végül teszteltük, hogy az mTOR inhibitor kezelés segítheti-e más, a colon carcinomák terápiájában alkalmazott kezelés hatékonyságát. Ezért az mTOR gátló rapamycin, illetve NVP-BEZ235 és a ciszplatin kombinációk hatásait vizsgáltuk *in vitro* három, eltérő mTORI érzékenységű EGFRI rezisztens colon carcinoma sejtvonalban.

Eredményeink: a) megfigyeltünk ciszplatin érzékenység különbségeket a sejtvonalak között, az RKO sejtek rezisztensnek bizonyultak; b) az mTOR gátló kezelés - legjelentősebben (önmagában is szignifikánsan) a dual inhibitor NVP-BEZ235 - csökkentette a ciszplatin és EGFR inhibitor rezisztens RKO sejtek proliferációját; c) a duál mTOR inhibitor kezelés szignifikánsan fokozza a ciszplatin anti-proliferatív hatásait az mTOR inhibitor kezeléssel szemben kevésbé érzékeny, EGFR inhibitor rezisztens colon carcinoma sejtek *in vitro* tenyészteiben (HT29 and SW620) is (21. ábra).





**20. ábra.** A rapamycin fokozta az EGFR-ek proliferáció gátló hatását colon carcinoma sejtekben in vitro (Alamar Blue teszt eredmények). Rapamycin (50 ng/ml) és EGFRi kombinációk (gefitinib 1  $\mu$ M, cetuximab 10  $\mu$ M; 72h) proliferációs hatásai colon carcinoma sejtvonalakban (a); ill. a rapamycin, dual mTOR inhibitor NVP-BEZ235 (N) és az mTORC1-C2 inhibitor PP242 (P) + gefitinib (G) kombinált kezelések hatásai colon carcinoma sejtvonalakban (b) 72h-ás kezelés után.



**21. ábra.** A Rapamycin nem, csak az NVP-BEZ235, mTOR és PI3K dual inhibitor, fokozza szignifikánsan a ciszplatin kezelés proliferáció gátló hatásait mindhárom colon carcinoma sejtvonalban, beleértve a ciszplatin és EGFR-ira rezisztens RKO sejteket, 72 órás kezelés után. Alamar Blue proliferációs teszt.

## V. Megbeszélés

### V.1. Humán colon carcinomás szövetminták vizsgálatainak eredményei

Korábbi vizsgálatokban, amelyekben a humán vastagbél-daganatok mTOR aktivitását jellemezték az esetek 2/3-ában mutatták ki a daganatsejtek fokozott mTOR aktivitását, mint ezt a daganattípust is jellemző különbséget [127, 134]. Vizsgálatainkban az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék és foszforilált formáik *in situ* expresszióját tanulmányoztuk, az előbbi eredményeket megerősíti, hogy az általunk vizsgált esetek több mint 70%-ában mutattunk ki magas mTOR aktivitást a tumoros szövetekben. Saját eredményeink azonban arra utaltak, hogy a Dukes' stádiumtól és a gradingtől független a kimutatott magas mTOR aktivitás a colorectalis carcinomákban. Dukes's B – C és D stádiumokban is hasonlóan magas arányú (66,66-76%) a magas mTOR aktivitás, csupán a C1 és C2 stádiumokban láttunk a megoszlásban valami különbséget, de mivel C1 stádiumú beteg lényegesen kevesebb ebben az értékelésben a C csoportot összevontuk). Mások, csak IIIB stádiumú colon carcinomákat vizsgálva mutattak ki hasonló arányban magas mTOR aktivitást a daganatsejtekben. [135]

Több korábbi vizsgálat utalt arra, hogy az mTOR aktivitás legszenzitívebb markere formalinban fixált, paraffinba ágyazott szöveti metszetekben a foszforilált riboszomális p-S6 fehérje kimutatása [136]. Saját vizsgálatainkban a fokozott p-mTOR expressziót mutató esetek 97%-ában igazoltunk magas p-S6 szintet is. Ez az adat megerősíti és elsőként támasztja alá valódi összehasonlító vizsgálattal azokat az ajánlásokat, amelyekben az mTOR aktivitás szöveti szintű igazolására a p-S6 expresszió igazolását javasolják, olyan esetekben, amikor a p-mTOR ellenanyag vagy más direkt target fehérjék kimutathatósága megkérdőjelezhető (a foszforilált motívumok degradációja pl. p-Akt, p-mTOR, vagy, egyes pl. p-4EBP1 vagy p-p70S6K ellenanyagok aspecifikus reakciói). Összesen 2 olyan esetünk volt, ahol alacsony p-S6 expresszió mellett erőteljes p-mTOR immunhisztokémiai festődést figyeltünk meg, azonban ezekben magas Rictor expresszió mellett, ami utal az aktív mTOR kináz mTORC2 komplexbeni előfordulására és annak magas aktivitására, alacsony vagy hiányzó mTORC1 aktivitás mellett.

A 103 esetből összesen 68-ban találtunk magas mTOR aktivitást, amihez magas Rictor expresszió vagy kiegyensúlyozott Raptor és Rictor expresszió társult. Ezekben az

esetekben az mTOR aktivitás az mTORC1 és az mTORC2 komplexekben egyaránt megjelenhet. Vizsgálatainkban az mTOR kináz aktivitását többféleképpen is igazoltuk a malignus sejtekben: a. egyrészt az aktív kináz jelenlétét és mennyiségi különbségeit mutattuk ki anti-p-mTOR immunreakciókkal; b. másrészt a két komplex mennyiségi és aktivitás eltéréseinek jellemzéséhez az mTORC1 esetében a p-4EBP1, p-p70S6K, illetve p-S6 fehérjéket (mTORC1 target fehérjék); vagy c. mTORC1/2 komplexekre jellemző specifikus alkotó elemek (Rictor, Raptor) jelenlétét és mennyiségi különbségeit vizsgáltuk in situ. Eredményeink elsőként igazolják specifikus vizsgálattal annak a két közleménynek adatait, amelyekben a p-Akt illetve Akt1-2 immunfestések alapján a colon carcinomák 60%-ában magasabb mTORC2 aktivitást valószínűsítettek [127, 137]. Az Akt fehérjékben többféle foszforilációs motívum található, amelyeket nemcsak az mTORC2 kináz aktivitása befolyásol, hanem számos más kinázé is. A korábbi vizsgálatokban az mTORC2 aktivitáshoz kötött Ser 473 foszforilációt nem tudták megkülönböztetni más foszforilációs mintázatú Akt fehérjéktől, csak pan p-Akt fehérje kimutatást végeztek. Emellett ezeknek a foszfo-proteineknek a stabilitása és a vizsgálatokban felhasznált antitestek specifikusa kérdéses lehet [138]. Önmagában az foszforilált Akt fehérje vizsgálata az mTORC2 komplex aktivitás meghatározásához tehát nem elégséges. Saját vizsgálatunk az első, amelyben az mTOR aktivitás igazolása kiegészül a két komplex aktivitási és mennyiségi különbségeit is jelző reakciókkal colon carcinomákban. Nem csupán egy marker alkalmazására szorítkozik az mTOR aktivitás és az Akt aktivitásának immunhisztokémiai jellemzéséhez, hanem kombinálja a p-mTOR, p-S6, p-4EBP1, Rictor és Raptor expresszió értékelését is. A kidolgozott immunpanellünk jelentőségét ábra segítségével foglaltuk össze (22. ábra). Ide kapcsolódik az a korábbi munkánk, ahol diffúz nagy-Bsejtes lymphomák rosszabb prognózisú csoportjában szintén az mTORC2 komplex aktivitás jelenlétét mutató emelkedett Rictor expressziót figyeltünk meg (Márk Ágnes PhD disszertációja [139]). Ez a közlemény amelynek elkészítésében én is résztvettem szolgált colon carcinomák vizsgálatához alkalmazott immunreakciók kidolgozásának alapjául is.

Azt ugyan már korábban leírták, hogy az mTOR kináz mRNS vagy fehérje overexpresszió negatív prognosztikai marker lehet [137, 140, 141], de ezekben a vizsgálatokban csupán össz fehérje expressziót hasonlítottak össze. Ezzel szemben mi az előbbieken túl az mTOR kináz fehérje aktív formájának mennyiségi változásait, a

komplexek mennyiségi változásait és a két különböző komplex aktivitásának jeleit is vizsgáltuk. Sőt, diagnosztizált klinikai mintákban a kimutatható aktivitásváltozások prognosztikai jelentőségét statisztikai módszerekkel is analizáltuk a vizsgálatba bevont standard terápiás protokoll (célzott terápia nélkül) szerint kezelt esetekben. A terápiás, túlélési adatok és a kapott mTOR aktivitási adatok alapján a magas mTOR aktivitás és a Rictor overexpresszió a rossz prognózis jele. A Rictor, Raptor (mTORC2/mTORC1 karakterisztikus fehérjék) és a foszforilált mTOR aktivitást jellemző fehérjék kombinált értékelése még szorosabb korrelációt mutatott a betegek túlélésével. A leghosszabb, minden esetben 5 évet meghaladó túlélése azoknak a betegeknek volt, akiknél alacsony mTOR aktivitást, azt is mTORC1 komplexben (domináns Raptor expresszió) tapasztaltunk. Szignifikáns összefüggést mutattunk ki a jobb prognózis és az mTORC2 aktivitás hiánya mellett megfigyelt alacsony mTOR aktivitás, illetve az mTORC1 komplex jelenlétéhez köthető mTOR aktivitás között ( $p=0.00178$ ). Ezek alapján colon carcinomákban javasoljuk az mTOR aktivitáshoz kapcsolódó fehérjék mennyiségének és aktivitásának vizsgálatát a betegség prognózisának meghatározásához.

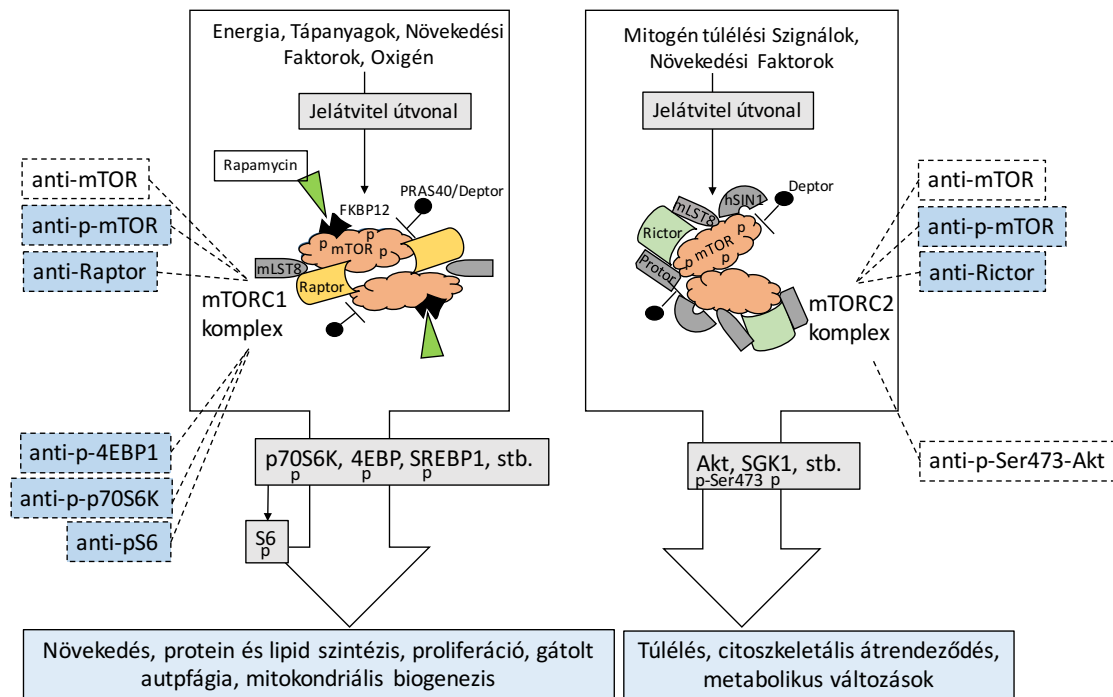
Számos szerző egyetért abban, hogy az mTOR gátló kezelések javíthatják a hagyományos daganatkezelések hatékonyságát és segíthetnek az esetlegesen kialakuló terápiás rezisztencia kivédésében [62, 142-144]. Eredményeinkből is egyértelmű azonban, hogy a magas mTOR aktivitás nagyon gyakran társul mTORC2 aktivitással humán colon carcinomákban. A Rictor overexpresszió pedig előrevetítheti a hagyományos rapalog (mTORC1 gátló) készítményekkel szembeni rezisztenciát, vagy nem megfelelő, elégtelen terápiás választ. Az mTORC2 komplex aktivitás Rapamycin érzékenysége ugyan jelenleg is vitatott [145], az eddig lezárult fázisvizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az mTORC1 gátlók önmagukban, kombináció nélkül nem elég hatásosak [103, 125, 146, 147], ami az mTORC2 komplex aktivitás általunk tapasztalt előfordulásának klinikai jelentőségét hangsúlyozza. A hagyományos rapalog kezelések *in vivo* csak részben gátolják az mTOR aktivitását és citosztatikus hatásuk miatt a daganat eliminálásra önmagukban nem alkalmasak. Nem véletlen a rapalogok alacsony hatékonysága ezekben a klinikai vizsgálatokban, hiszen saját eredményeink is rapalog rezisztenciára engednek következtetni az esetek 2/3-ában. A jelenlegi gyógyszeripari fejlesztések célja olyan gátlószerek fejlesztése pl. a dual inhibitorok vagy a legújabb rapamycin rezisztenciát okozó mutációk esetén is hatékony mTOR kináz gátlók, amelyek

jóval hatékonyabbak a hagyományos rapalógoknál. Nem szabad azonban megfeleldkezni a mellékhatások várható súlyosbodásáról, különösen kombinációs terápiák esetében [148]. Jelenleg több klinikai fázis kísérlet van folyamatban ezekkel a szerekkel és kombinációs lehetőségekkel [149], de még mindig kevés az olyan vizsgálat, ahol beteg szelekció történik legalább a target (magas mTOR aktivitás meghatározása), vagy amire igazán szükség lenne, az mTORC2 komplex aktivitásának igazolása alapján. Olyan munkákat sem ismerünk egyenlőre, ahol a két komplex mennyiségének, aktivitásának vizsgálatát akár utólag összevetették volna a kapott terápiás eredményekkel. A markervizsgálatok alapján végzett betegszelekció valószínűleg javíthatna a terápiás eredményeken. A magas mTOR aktivitás, különösen az mTORC2 komplexhez kapcsolódó, arra irányította a figyelmet, hogy talán más rezisztencia problémák hátterében (pl. HER2 vagy BRAF inhibitor rezisztencia) is ennek szerepe lehet [150].

A fokozott Rictor expresszió esetén fontos lehet a fehérje membrán közeli akkumulációja, amit colon carcinoma sejtekben csak ritkán figyeltünk meg. Ez inkább más hámdaganatokban lehet jellemző (pl. tüdődaganatok). A Rictor-t a fokális adhézíós komplexben figyelték meg ezekben az esetekben, ami korábban kimutatott adatok alapján a daganatsejtek malignus fenotípusát más módon befolyásoló tényező is lehet, a sejtek metasztatizis képző képességeit segítheti elő az mTOR aktivitástól független módon [151].

Összefoglalva, a carcinogenezisben és progresszióban igazoltan szerepet játszó mTORC1 és mTORC2 komplexhez kötődő mTOR aktivitás a colon carcinomák nagy százalékát jellemzi, ezért daganatterápiás célpont lehet. Ebben azonban kiemelkedő jelentősége van annak az általunk elsőként igazolt eredménynek, hogy a vizsgált magas mTOR aktivitású colon carcinomák 2/3-ában mTORC2 komplexhez köthető, a korábbról már ismert mTOR aktivitás. Kimutattuk, hogy a daganat prognózisa ebben az alcsoportban a legkedvezőtlenebb és a terápi rezisztencia is gyakori. Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy a jelenleg záruló rapalóg vagy más mTOR gátló klinikai fázisvizsgálatok eredményeinek értékelése során, vagy a jövőben induló mTOR gátló kezelések megkezdése előtt az mTOR aktivitás specifikusabb meghatározása és akár annak szöveti heterogenitás vizsgálata mennyire fontos [152, 153]. Az ilyen tanulmányok rávilágíthatnak arra is, hogy miért volt sikertelen vagy kevésbé sikeres számos Everolimus vagy más mTOR gátló szer klinikai vizsgálata [125, 144-149, 154].

Az általunk beállított és alkalmazott immunhisztokémiai panel (a p-mTOR, p-p70S6K, p-4EBP1, p-S6, Rictor és Raptor értékelése) (22. ábra), illetve egy a jövőben részletesen kidolgozandó quantitativ *in situ* mTORC1 és mTORC2 aktivitás vizsgálat, pl. az általunk is tesztelt Duolink-reakció formol-paraffinos szövetmintákban, jelentős támogatást nyújthat a colorectális carcinomák prognózisának pontosításához és hatékonyabb terápiás protokollok tervezéséhez.



**22. ábra.** A tesztelt immunhisztokémiai festések alapján az mTOR aktivitás karakterizálásához javasolt immunpanell célfehérjéi (kék). A két komplex közös eleme az mTOR kináz, mennyiségét az anti-mTOR, az aktív kináz jelenlétét anti-p-mTOR festés mutatja. A komplexek arányának vizsgálatához az anti-Raptor (mTORC1) és anti-Rictor (mTORC2), míg aktivitásuk jellemzéséhez foszforilált targetjeik, a p-p70S6K, p-4EBP1 (mTORC1) és p(Ser473)Akt (mTORC2), illetve a legjobb mTORC1 aktivitás markernek tekinthető p-S6 immunhisztokémiai kimutatása, illetve ezek kombinációi javasolhatók.

## V.2. *In vitro* eredményeink jelentősége

A célzott terápiás kezelésekkel (pl. EGFR gátló kezelése) és hagyományos kemoterápiával szemben megjelenő rezisztencia jól ismert számos rosszindulatú tumorban, így vastagbél daganatok esetében is. A rezisztencia áttöréséhez a háttérükben álló molekuláris mechanizmusok megismerésére és új megközelítésekre van szükség. Számos elképzelés szerint az mTOR-inhibitorok, illetve targetjük, az mTOR kináz központi szabályozó szerepe - elsősorban a sejtnövekedést és proliferációt támogató funkciók – miatt fontos szerepet játszhatnak többféle rezisztencia mechanizmus *in vitro* és *in vivo* leküzdésében. Előbbiek ellenére a különböző monoterápiás és a jelenlegi kombinált mTOR gátló kezelések fázisvizsgálatainak eredményei elmaradnak az várakozásoktól, aminek számos oka lehet [155-157]. Munkánkban mTOR gátlók hatását eltérő mTOR komplex aktivitási mintázatot mutató, EGFR inhibitor rezisztens colon carcinoma sejtvonalban tudtuk kimutatni *in vitro*. Ezek az inhibitorok fokozták a ciszplatin vagy az EGFR inhibitor hatását is, amely a monoterápiában kevésbé mTORI érzékeny sejtekben jelentősnek bizonyult. A tapasztalt anti-proliferatív hatás a hosszútávú mTORI-kezelések esetében talán még érdekesebb lehet, különösen azért, mert sok *in vivo* xenograft modellben a hosszabbtávú mTOR inhibitor kezelés jelentősen gátolja a tumornövekedést. Számos mechanizmus, például a tumorsejtekben *in vivo* apoptózis indukciója, is állhatnak az előbbi megfigyelések háttérében, ami *in vitro* rövidebb kezelésekben még nem volt egyértelmű [72, 143, 158, 159]. Saját vizsgálatainkban a kettős inhibitorok, illetve az mTORC1 és C2 kettős inhibitor monoterápiás kezelések rendkívül hatásosnak bizonyultak a legtöbb vizsgált sejtvonalban, kivéve a GC3 - ismert p53 mutáns (vad típusú K-Ras, B-Raf, PI3KCa) és a HCT116 - Ras és PI3KCa mutáns - colon carcinoma sejteket. Korábban leírták, hogy a PI3KCa mutációk összefüggést mutatnak adott sejtvonalak rapamycin érzékenységevel, például emlődaganatokban [104]. Ennek ellenére mi azt tapasztaltuk, hogy a HCT116 sejtek, amelyekben általunk is kimutatott PI3KCa mutáció ismert, rapamycin, mTOR inhibitor rezisztens. Ebben a sejtvonalban mTOR aktivitás magas Rictor expresszióval járt, ami nagymennyiségű mTORC2 komplex jelenlétére és abban megjelenő mTORC2 komplex aktivitásra utal. Ez már önmagában megmagyarázhatja az mTORC1 gátlókkal szembeni rezisztenciát. Míg a HCT116 sejtekben ugyancsak jellemző Ras-mutáció nemcsak a rapamycin, hanem más mTOR inhibitorokkal és más terápiás szerekekkel szembeni rezisztenciával is

összefüggésbe hozható. Az is igaz azonban, hogy több olyan eredmény is ismert, amelyek szerint bizonyos mTORI gátló kezelések áttörhetik az EGFR rezisztenciát Ras mutáns sejtekben [160, 161]. Ezt a HCT116 sejtek EGFR és a rapamycin kombinációs kezelés esetében mi is megfigyeltük, ahol a monoterápiában alkalmazott *in vitro* rapamycin kezelés ugyan nem befolyásolta a HCT116 sejtek proliferációját, de az EGFR gátló kezeléssel kombinációban szignifikáns proliferáció gátló hatású volt. Vizsgálatunk újdonsága az is, hogy korábban egyszerre ennyiféle, eltérő genetikai háttérrel rendelkező sejtvonalon nem végeztek EGFR és mTOR gátló kezelést [162, 163].

*In vitro* vizsgálatainkban azt is kimutattuk, hogy a ciszplatin rezisztencia is áttörhető rapamycin kombinált kezeléssel. Így akár alacsonyabb dózisú ciszplatin, mTOR gátló kezeléssel kombinálva is hatásos lehet bizonyos rezisztens sejtekben. Hasonló eredményeket korábban emlő daganatok, tüdő daganatok és egyes carcinoma modellek esetén is leírtak [164, 165]. Utóbbi vizsgálatokban az alacsony dózisú ciszplatin autofágiát indukált a sejtekben, a rapamycin kombináció pedig ezt tovább fokozta és ezekben a sejtekben egyértelmű daganatellenes hatást mutatott [147, 166-168].

Eredményeink alapján, a vastagbél daganatok kezelésében az mTORI kombináció alkalmazása hasznos lehet nemcsak az EGFR gátló, hanem akár a platina alapú hagyományos terápiában is. Ilyenkor az mTOR komplex aktivitás meghatározása [150] és az Akt/mTOR jelátviteli utak [156, 169] jellegzetes onkogén vagy tumorszuppresszor mutációinak vizsgálata segíthet a kombinációhoz az optimális mTOR gátló kiválasztásában [170]. Előbbiek pedig fontos szerepet játszhatnak a terápiás döntésekben, ahol a kombinációs terápiára megjelenő, vagy fokozódó mellékhatásokat és azok egyéni különbségeit, ill. azok lehetséges markereit is szükség szerint figyelembe kell venni [171-173]. A lymphomákkal kapcsolatos közelmúltban közölt eredményeink [150], valamint az értekezésben tárgyalt munkáink hangsúlyozzák, hogy hagyományos kezelés mellett colon carcinomákban és más daganatokban is az mTORC2 komplexhez kötött mTOR aktivitás és a kedvezőtlen prognózis összefüggést mutatnak.

A dolgozatomban bemutatott betegcsoportok mTOR aktivitás és klinikai terápiás eredményeinek összehasonlító vizsgálata, valamint *in vitro* adataink is arra utalnak, hogy a megfelelő beteg kiválasztási kritériumok meghatározása, segíthet a megfelelő célpont(ok) és az optimális terápiás kombinációk tervezésében. Eredményeink alapján az EGFR és az Akt/mTOR útvonalhoz köthető mutációk mellett a mTORC1 és C2



komplexek kiváló célpontok lehetnek azokban az esetekben, ahol egyéb terápiás próbálkozások nem hoznak eredményt. Gastrointestinális daganatokban mások is jutottak a miénkhez hasonló eredményre, így gyomor carcinomákban Rictor overexpressziót és párhuzamosan rapamycin rezisztenciát figyeltek meg [174]. Eredményeink alátámasztják, hogy az mTOR gátlók a tumorokban többféle módon hathatnak: a) lassíthatják a daganatnövekedést a kezelés korai fázisában; b) kombinált protokollokban fokozhatják más kezelés hatékonyságát, vagy gátolhatják a terápia rezisztens klónok megjelenését (pl. alacsony dózisú mTORI-k alkalmazása) vagy; c) agresszív terápiát követően alkalmazva akár monoterápiában, vagy még tolerálható alacsony dózisú kemoterápia mellett, elősegíthetik a tartós tumor és a betegségmentes túlélést [175, 176]. Saját eredményeink és mások kísérletes és klinikai adatai [177] azonban hangsúlyozzák a megfelelő időzítés és a valódi célpontok - különösen az mTORC1 és C2 aktivitás – egyénre szabott validálásának jelentőségét.

## VI. Következtetések

### *I. Az mTOR jelút elemeinek vizsgálatával nyert új megfigyelések colorectális carcinoma klinikai mintáiban:*

- A Dukes stádiumtól és a gradingtől függetlenül jellemző a magas mTOR aktivitás.
- A p-S6 expresszió az egyik legalkalmasabb marker, amellyel az mTORC1 aktivitását, vagy akár az mTOR kináz aktivitását meghatározhatjuk formalinban fixált, paraffinos mintákban, ha a p-mTOR, vagy más direkt target fehérjék kimutathatósága megkérdőjelezhető.
- A vizsgált colon carcinomák 2/3-ában mTORC2 komplexhez köthető a magas mTOR aktivitás.
- Az általunk kidolgozott immunhisztokémiai panel, ahol az p-mTOR kimutatása kiegészül a p-S6, p-4EBP1, Rictor és Raptor expresszió vizsgálatával, alkalmas az mTOR aktivitás *in situ* jellemzésére colon carcinoma szöveti metszeteiben.
- A magas mTOR aktivitás Rictor túlsúllyal (mTORC2 komplex aktivitás) szignifikáns pozitív korrelációt mutat a colon carcinomák kedvezőtlen prognózisával (mindkét paraméter független prognosztikus faktor), míg az mTORC1 komplexhez köthető alacsony mTOR aktivitás kedvezőbb kimenetellel, akár a gyógyulás esélyével járhat.

### *II. Humán colon carcinoma sejtvonalak in vitro vizsgálatával kapcsolatos új megfigyelések:*

- A duál (mTOR és PI3K) inhibitorok, illetve az mTORC1 és C2 kettős inhibitor monoterápia hatásos proliferáció-, és tumornövekedés gátló kezelésnek bizonyultak a legtöbb vizsgált EGFR rezisztens colon carcinoma sejtvonalban.
- Több tumorsejt modellben megerősítettük, hogy a vastagbél daganatok kezelésében az mTOR inhibitor kombinációk hasznosak lehetnek EGFR gátló, és akár a platina alapú, hagyományos terápia támogatásában is.

## VII. Összefoglalás

Onkológiai kezelések során gyakran tapasztalható rezisztencia kialakulása, ezek hátterében a daganat heterogenitás és a tumorevolúció következtében megjelenő szabályozási zavarok megismerése fontos feladat. A jelátviteli hálózatban, a daganatsejtek proliferációjának, túlélésének szabályozásában a PI3K/Akt/mTOR útvonal aktivitásának szerepe jól ismert. Az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerin/treonin protein kináz - kétféle funkciójában is eltérő multiprotein komplexben - központi szerepet játszik az előbbi folyamatokban.

Munkámban az mTOR jelátviteli út aktivitásának jelentőségét vizsgáltam humán vastagbél-daganatokban és *in vitro* modelljeikben. Az mTOR komplexek mennyiségét, aktivitását jellemző fehérjéket immunfestéssel szöveti multiblokk metszeteken vizsgáltuk. 103 beteg mintáinak jellemzőit és klinikai, túlélési adatok összefüggéseit és eltérő mutációs profillal rendelkező colon carcinoma sejtvonalakban az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expresszióját (Western blot, immuncitokémia és Duolink festés); mTOR-, EGFR inhibitor és ciszplatin érzékenységet (Alamar Blue proliferáció teszt, apoptózis - áramlási citometria) vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a humán colon carcinomák stádiumtól független magas mTOR aktivitással jellemezhetők és ez az esetek két harmadában mTORC2 komplexhez köthető; míg kombinált foszfo-protein és Rictor/Raptor expresszió vizsgálatainkban elsőként írtuk le, hogy a magas mTORC2 aktivitás (Rictor overexpresszió) a rossz, az alacsony mTOR aktivitás és az mTORC2 komplex hiánya, kis mennyisége pedig a jó prognózissal szignifikánsan összefügg. A sejtvonalakban az ismert mutációknak megfelelően igazoltuk az EGFR inhibitor rezisztenciát, az mTOR aktivitással és érzékenységgel összefüggő célfehérjék expresszióját, egyedi Rictor/Raptor, illetve mTORC1, mTORC2 aktivitását. Az mTOR gátlók EGFR inhibitor és ciszplatin érzékenyítő hatásait mutattuk ki még a kevésbé mTOR inhibitor érzékeny sejtvonalakban is.

A vizsgálatainkban használt immunhisztokémia panel alkalmas az mTORC1 és mTORC2 aktivitás pontos meghatározására colon carcinomákban és más daganatokban is. A meghatározható mTORC1, mTORC2 aktivitás különbségek segíthetik a betegség terápiás érzékenységeinek és prognózisának meghatározását. Az előbbiekből alapján tervezhető mTOR inhibitor kombinációk pedig hatékonyak lehetnek az EGFR inhibitor, vagy akár a platina-alapú terápia potenciozásában is.

### VIII. Summary

In the course of oncological treatments the development of resistance is often observed; therefore, it is important to study the background effects of tumor evolution and heterogeneity. The role of the PI3K/Akt/mTOR pathway is well known both in the signalling network and in the regulation of tumor cell proliferation and survival. mTOR (mammalian target of rapamycin) is a serine/threonine protein kinase – in two multiprotein complexes with different functions – plays a central role in the above-mentioned process.

In my work, the importance of mTOR signaling activity were studied in human colon tumors and *in vitro* models. We have evaluated proteins which are associated with the amounts and the activities of mTOR complexes using immunohistochemical methods in human tissue multiblocks. The clinical data, the survival correlation of 103 patients and the expression of proteins are related to mTOR activity (Western blot, immunocytochemistry and Duolink staining); sensitivity against mTOR-, EGFR-inhibitor and cisplatin (Alamar Blue assay, apoptotic – flow cytometry) were analyzed in colon carcinoma cell lines with different genetic backgrounds.

It has been shown that human colon carcinomas are characterized by high mTOR activity independently of the stage; and this activity can be related to mTORC2 complex in two thirds of cases. According to the combined phosphoprotein and Rictor/Raptor expression evaluation, we have described for the first time that high mTORC2 activity (Rictor overexpression) was associated with poor prognosis whereas low mTOR activity and mTORC2 expressions showed significant correlation with good prognosis. The EGFR resistance, the expressions of mTOR activity- and mTORI sensitivity-related proteins and in addition, unique alternations of Rictor/Raptor or mTORC1 and mTORC2 expressions were described in colon carcinoma cell lines.

The immunohistochemical staining panel used in our investigations is appropriate to determine the activity of mTORC1 and mTORC2 not only for colon carcinomas but also for other tissue types. The described differences between mTORC1 and mTORC2, activity may be useful to evaluate therapy sensitivity and prognosis. Based on this, mTORI could be helpful in combination with both EGFR inhibitor and platinum-based therapies of colon carcinomas.

**IX. Irodalomjegyzék**

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65: 87-108.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2017) Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66: 683-691.
3. Boyle P, Langman JS. (2000) ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321: 805-808.
4. Hagggar FA, Boushey RP. (2009) Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, 22: 191-197.
5. Rosai J. Gastrointestinal Tract: Large Bowel. In: Rosai J, Ackerman LV, Rosai and Ackerman's surgical pathology 10<sup>th</sup> edition. Mosby, New York, 2011: 731-802.
6. Turner JR, Lingen MW. Oral Cavities and Gastrointestinal Tract. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins basic pathology 10<sup>th</sup> edition. Elsevier, Philadelphia, 2018: 583-636.
7. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system 4th edition. IARC Press, Lyon, 2010: 103-119.
8. Fleming M, Ravula S, Tatishev SF, Wang HL. (2012) Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3: 153-173.
9. Compton CC, Greene FL. (2004) The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*, 54: 295-308.
10. Gonzalez R. (2017) Adenocarcinoma of colon. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumoradenocarcinoma.html>.
11. Abdulkader M, Abdulla K, Rakha E, Kaye P. (2006) Routine elastic staining assists detection of vascular invasion in colorectal cancer. *Histopathology*, 49: 487-492.
12. Bellis D, Marci V, Monga G. (1993) Light microscopic and immunohistochemical evaluation of vascular and neural invasion in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 189: 443-447.

13. Cserni G, Sejben I, Bori R. (2013) Diagnosing vascular invasion in colorectal carcinomas: improving reproducibility and potential pitfalls. *J Clin Pathol*, 66: 543-547.
14. Hugén N, Brown G, Glynne-Jones R, de Wilt JH, Nagtegaal ID. (2016) Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 13: 361-369.
15. Berezowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. (1996) Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. *Mod Pathol*, 9: 426-429.
16. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. (2004) The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol*, 17: 1392-1399.
17. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. (2005) Colorectal cancer. *Lancet*, 365: 153-165.
18. Lynch HT, de la Chapelle A. (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348: 919-932.
19. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. (2012) Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*, 5: 19-27.
20. Boland CR, Yurgelun MB. (2017) Mutational cascades in cancer. *Oncotarget*, 8: 41784-41785.
21. Li CJ, Zhang X, Fan GW. (2014) Updates in colorectal cancer stem cell research. *J Cancer Res Ther*, 10: 233-239.
22. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powel SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304: 554.
23. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268: 1336-1338.

24. Lao VV, Grady WM. (2011) Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8: 686-700.
25. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Campton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR. *AJCC cancer staging manual* 8<sup>th</sup> edition. Springer, New York, 2016: 113-125.
26. Turner RR, Li C, Compton CC. (2007) Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 6871-6876.
27. No authors listed. (2016) Colorectal cancer. *Nurs Stand*, 30: 17.
28. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, Jamison P. (2006) Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*, 107: 1153-1161.
29. de Jong AE, Morreau H, Nagengast FM, Mathus-Vliegen EM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Cats A, Vasen HF. (2005) Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*, 100: 139-143.
30. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. (2017) Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67: 177-193.
31. Grande M, Milito G, Attinà GM, Cadeddu F, Muzi MG, Nigro C, Rulli F, Farinon AM. (2008) Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World J Surg Oncol*, 6: 98.
32. Buecher B. (2016) Colorectal adenomatous polyposis syndromes: Genetic determinism, clinical presentation and recommendations for care. *Bull Cancer*, 103: 199-209.
33. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. (2008) Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer*, 7: 27-39.
34. Johnson IT, Lund EK. (2007) Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 26: 161-181.
35. Larsson SC, Wolk A. (2006) Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*, 119: 2657-2664.

36. Alexander DD, Weed DL, Miller PE, Mohamed MA. (2015) Red Meat and Colorectal Cancer: A Quantitative Update on the State of the Epidemiologic Science. *J Am Coll Nutr*, 34: 521-543.
37. Willett WC. (2005) Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA*, 293: 233-234.
38. Bazensky I, Shoobridge-Moran C, Yoder LH. (2007) Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nurs*, 16: 46-51.
39. Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S, JPHC Study Group. (2007) Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Causes Control*, 18: 199-209.
40. Campbell PT, Cotterchio M, Dicks E, Parfrey P, Gallinger S, McLaughlin JR. (2007) Excess body weight and colorectal cancer risk in Canada: associations in subgroups of clinically defined familial risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16:1735-1744.
41. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. (2006) Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med*, 166: 629-634.
42. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. (2008) Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134: 388-395.
43. Jayasekara H, English DR, Haydon A, Hodge AM, Lynch BM, Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Southey MC, Jenkins MA, Room R, Hopper JL, Milne RL, Buchanan DD, Giles GG, MacInnis RJ. (2018) Associations of alcohol intake, smoking, physical activity and obesity with survival following colorectal cancer diagnosis by stage, anatomic site and tumor molecular subtype. *Int J Cancer*, 142: 238-250.
44. Leung WC, Foo DC, Chan TT, Chiang MF, Lam AH, Chan HH, Cheung CC. (2016) Alternatives to colonoscopy for population-wide colorectal cancer screening. *Hong Kong Med J*, 22: 70-77.
45. Knudsen AB, Zauber AG, Rutter CM, Naber SK, Doria-Rose VP, Pabiniak C, Johanson C, Fischer SE, Lansdorp-Vogelaar I, Kuntz KM. (2016) Estimation of



- Benefits, Burden, and Harms of Colorectal Cancer Screening Strategies: Modeling Study for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*, 315: 2595-2609.
46. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ, American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group, US Multi-Society task Force, American College of Radiology Colon Cancer Committee. (2008) Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*, 58: 130-160.
  47. Chen PC, Lee JC, Wang JD. (2015) Estimation of Life-Year Loss and Lifetime Costs for Different Stages of Colon Adenocarcinoma in Taiwan. *PLoS One*, 10: e0133755.
  48. Desch CE, Benson AB 3<sup>rd</sup>, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD, Pfister DG, Virgo KS, Petrelli NJ. (2005) Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol*, 23: 8512-8519.
  49. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB 3<sup>rd</sup>, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, Covey A, Dilawari RA, Early DS, Enzinger PC, Fakih MG, Fleshman J Jr, Fuchs C, Grem JL, Kiel K, Knol JA, Leong LA, Lin E, Mulcahy MF, Rao S, Ryan DP, Saltz L, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous C, Thomas J, Venook AP, Willett C. (2009) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 7: 778-831.
  50. Benson AB 3<sup>rd</sup>, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Enzinger PC, Fichera A, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffs S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wu CS, Gregory KM, Freedman-Cass D. (2017) Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 15: 370-398.

51. Varghese, A. (2015) Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Clin Colon Rectal Surg*, 28: 256-261.
52. Iyer L, Ratain MJ. (1998) Clinical pharmacology of camptothecins. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42: 31-43.
53. Tsai YJ, Link JK, Chen WS, Jiang JK, Teng HW, Yen CC, Lin TC, Yang SH. (2016) Adjuvant FOLFOX treatment for stage III colon cancer: how many cycles are enough? *Springerplus*, 5: 1318.
54. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkapm FL, Vos AH, van Groenungen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonunu NF, Mol L, van Krienken JH, Dalesio O, Punt CJ. (2009) Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 360: 563-572.
55. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Korawski P. (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27: 663-671.
56. Yang YF, Wang GY, He JL, Wu FP, Zhang YN. (2017) Overall survival of patients with KRAS wild-type tumor treated with FOLFOX/FOLFIRI±cetuximab as the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96: e6335.
57. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. (2008) Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26: 5705-5712.
58. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. (2004) Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg*, 239: 818-825; discussion 825-827.
59. Ramos P, Bentires-Alj M. (2015) Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, 34: 3617-3626.
60. Kharraishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. (2014) The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other

- microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int*, 14: 41.
61. Colak S, Medema JP. (2014) Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. *FEBS J*, 281: 4779-4791.
  62. Brown KK, Toker A. (2015) The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. *F1000Prime Rep*, 7: 13.
  63. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN, Edwards BK. (2004) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*, 101: 3-27.
  64. Allemani C, Rachet B, Weir HK, Richardson LC, Lepage C, Faivre J, Gatta G, Capocaccia R, Sant M, Baili P, Lombardo C, Aareleid T, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Bolick S, Cress R, Elferink M, Fulton JP, Galceran J, Gózd S, Hakulinen T, Primic-Zakelj M, Rachtan J, Diba CS, Sánchez MJ, Schymura MJ, Shen T, Tagliabue G, Tumino R, Vercelli M, Wolf HJ, Wu XC, Coleman MP. (2013) Colorectal cancer survival in the USA and Europe: a CONCORD high-resolution study. *BMJ Open*, 3: e003055.
  65. Laplante M, Sabatini DM. (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122: 3589-3594.
  66. Macdonald AS. (2007) Use of mTOR inhibitors in human organ transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*, 3: 423-436.
  67. Ventura-Aguiar P, Campistol JM, Diekmann F. (2016) Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin Drug Saf*, 15: 303-319.
  68. LoRusso PM. (2016) Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors. *J Clin Oncol*, 34: 3803-3815.
  69. Wang M, Popplewell LL, Collins RH Jr, Winter JN, Goy A, Kaminski MS, Bartlett NL, Johnston PB, Lister J, Fanning SR, Tuscano JM, Beck JT, Kaya H, Robeva A, Fan J, Klimovsky J, Cheung W, Cherfi A, O'Connor OA. (2014) Everolimus for patients with mantle cell lymphoma refractory to or intolerant of bortezomib: multicentre, single-arm, phase 2 study. *Br J Haematol*, 165: 510-518.
  70. Ghobrial IM, Witzig TE, Gertz M, LaPlant B, Hayman S, Camoriano J, Lacy M, Bergsagel PL, Chuma S, DeAngelo D, Treon SP. (2014) Long-term results of the

- phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus (RAD001) in relapsed or refractory Waldenstrom Macroglobulinemia. *Am J Hematol*, 89: 237-242.
71. Smith SM, van Besien K, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, Smith S, Stiff P, Lester E, Modi S, Doyle LA, Vokes EE, Pro B. (2010) Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol*, 28: 4740-4746.
  72. Márk Á, Hajdu M, Váradi Z, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. (2013) Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease--a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*, 13: 250.
  73. Dorris JR 3<sup>rd</sup>, Jones S. (2014) Everolimus in Breast Cancer: The Role of the Pharmacist. *Ann Pharmacother*, 48: 1194-1201.
  74. Shtivelband MI. (2013) Everolimus in hormone receptor-positive advanced breast cancer: targeting receptor-based mechanisms of resistance. *Breast*, 22: 405-410.
  75. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D. (2010) PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*, 177: 1647-1656.
  76. Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R. (2016) TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem Sci*, 41: 532-545.
  77. Hare SH, Harvey AJ. (2017) mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res*, 7: 383-404.
  78. Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC. (2010) Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem*, 285: 80-94.
  79. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137: 873-886.
  80. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25: 903-915.

81. Catena V, Fanciulli M. (2017) Deptor: not only a mTOR inhibitor. *J Exp Clin Cancer Res*, 36: 12.
82. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Schullely T, Carr SA, Sabatini DM. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16: 1865-1870.
83. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arrieumeriou C, Hall MN. (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*, 2: e1217.
84. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Dev Cell*, 11: 859-871.
85. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*, 40: 310-322.
86. Palavra F, Robalo C, Reis F. (2017) Recent Advances and Challenges of mTOR Inhibitors Use in the Treatment of Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 9820181.
87. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141: 290-303.
88. Yuan HX, Guan KL. (2015) The SIN1-PH Domain Connects mTORC2 to PI3K. *Cancer Discov*, 5: 1127-1129.
89. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*, 441: 1-21.
90. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. (2015) mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*, 34: 2239-2250.
91. Lang F, Pearce D. (2016) Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by the mTORC2/SGK1 pathway. *Nephrol Dial Transplant*, 31: 200-205.
92. Heikamp EB, Patel CH, Collins S, Waickman A, Oh MH, Sun IH, illei P, Sharma a, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Misra-Sen J, Horton MR, Powell JD. (2014)

- The AGC kinase SGK1 regulates TH1 and TH2 differentiation downstream of the mTORC2 complex. *Nat Immunol*, 15: 457-464.
93. Dazert E, Hall MN. (2011) mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*, 23: 744-755.
  94. Li J, Kim SG, Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19: 373-379.
  95. Yanik EL, Siddiqui K, Engels EA. (2015) Sirolimus effects on cancer incidence after kidney transplantation: a meta-analysis. *Cancer Med*, 4: 1448-1459.
  96. Xu M, Bu LM, Wu K, Lu LG, Wang XP. (2015) Rapamycin inhibits the proliferation of SW1990 pancreatic cancer cell. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19: 3072-3079.
  97. Lee CS, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Xu J, Ismailov II, Knoblauch M, Monreo TO, Ji R, Hanna AD, Joshi AD, Long C, Oakes J, Tran T, Corona BT, Lorca S, Ingalls CP, Narkar VA, Lanner JT, Bayle JH, Durham WJ, Hamilton SL. (2014) Ligands for FKBP12 increase Ca<sup>2+</sup> influx and protein synthesis to improve skeletal muscle function. *J Biol Chem*, 289: 25556-25570.
  98. van der Poel HG, Hanrahan C, Zhong H, Simons JW. (2003) Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res*, 30: 380-386.
  99. Seufferlein T, Rozengurt E. (1996) Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 56: 3895-3897.
  100. Dilling MB, Dias P, Shapiro DN, Germain GS, Johnson RK, Houghton PJ. (1994) Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*, 54: 903-907.
  101. Saunders PO, Weiss J, Welschinger R, Baraz R, Braadstock KF, Bendall LJ. (2013) RAD001 (everolimus) induces dose-dependent changes to cell cycle regulation and modifies the cell cycle response to vincristine. *Oncogene*, 32: 4789-4797.
  102. Martin LA, Pancholi S, Farmer I, Guest S, Ribas R, Weigel MT, Thornhill AM, Ghazoui Z, A'Hern R, Evans DB, Lane HA, Johnston SR, Dowsett M. (2012) Effectiveness and molecular interactions of the clinically active mTORC1

- inhibitor everolimus in combination with tamoxifen or letrozole in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res*, 14: R132.
103. Naruse T, Yanamoto S, Yamada S, Rokutanda S, Kawakita A, Kawasaki G, Umeda M. (2015) Anti-tumor effect of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 21: 765-773.
  104. Weigelt B, Warne PH, Downward J. (2011) PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene*, 30: 3222-3233.
  105. Zanardi E, Verzoni E, Grassi P, Necchi A, Giannatempo P, Raggi D De Braud F, Procopio G. (2015) Clinical experience with temsirolimus in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol*, 7: 152-161.
  106. Fleming GF, Ma CX, Huo D, Sattar H, Tretiakova M, Lin L, Hahn OM, Olopade FO, Nanda R, Hoffman PC, Naughton MJ, Plurad T, Conzen SD, Ellis MJ. (2012) Phase II trial of temsirolimus in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 136: 355-363.
  107. Jurczak W, Ramanathan S, Giri P, Romano A, Mocikova H, Clancy J, Lechuga M, Casey M, Boni J, Giza A, Hess G. (2018) Comparison of two doses of intravenous temsirolimus in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 59: 670-678.
  108. Seiler M, Ray-Coquard I, Melichar B, Yardley DA, Wang RX, Dodion PF, Lee MA. (2015) Oral ridaforolimus plus trastuzumab for patients with HER2+ trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 15: 60-65.
  109. Yee ML, Tan HH. (2017) Use of everolimus in liver transplantation. *World J Hepatol*, 9: 990-1000.
  110. Buti S, Leonetti A, Dallatomasina A, Bersanelli M. (2016) Everolimus in the management of metastatic renal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid*, 11: 23-36.
  111. Fine NM, Kushwaha SS. (2016) Recent Advances in Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Use in Heart and Lung Transplantation. *Transplantation*, 100: 2558-2568.

112. Sorrentino S, Giustino G, Mehran R, Kini AS, Sharma SK, Faggioni M, Farhan S, Vogel B, Indolfi C, Dangas GD. (2017) Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds Versus Everolimus-Eluting Metallic Stents. *J Am Coll Cardiol*, 69: 3055-3066.
113. García-Echeverría C. (2010) Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett*, 20: 4308-4312.
114. Dey N, Sun Y, Carlson JH, Wu H, Lin X, Leyland-Jones B, De P. (2016) Anti-tumor efficacy of BEZ235 is complemented by its anti-angiogenic effects via downregulation of PI3K-mTOR-HIF1alpha signaling in HER2-defined breast cancers. *Am J Cancer Res*, 6: 714-746.
115. Fazio N, Buzzoni R, Baudin E, Antonuzzo L, Hubner RA, Lahner H, DE Herder WW, Raderer M, Teulé A, Capdevila J, Libutti SK, Kulke MH, Shah M, Dey D, Turri S, Aimone P, Massacesi C, Verslype C. (2016) A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Anticancer Res*, 36: 713-719.
116. Bendell JC, Kelley RK, Shih KC, Grabowsky JA, Bergsland E, Jones S, Martin T, Infante JR, Mischel PS, Matsutani T, Xu S, Wong L, Liu Y, Wu X, Mortensen DS, Chopra R, Hege K, Munster PN. (2015) A phase I dose-escalation study to assess safety, tolerability, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of the dual mTORC1/mTORC2 kinase inhibitor CC-223 in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma. *Cancer*, 121: 3481-3490.
117. Guichard SM, Curwen J, Bihani T, D'Cruz CM, Yates JW, Grondine M, Howard Z, Davies BR, Bigley G, Klinowska T, Pike KG, Pass M, Chresta CM, Polanska UM, McEwen R, Delpuech O, Green S, Cosulich SC. (2015) AZD2014, an Inhibitor of mTORC1 and mTORC2, Is Highly Effective in ER+ Breast Cancer When Administered Using Intermittent or Continuous Schedules. *Mol Cancer Ther*, 14: 2508-2518.
118. Yu F, Zhao J, Hu Y, Zhou Y, Guo R, Bai J, Zhang S, Zhang H, Zhang J. (2016) The combination of NVP-BKM120 with trastuzumab or RAD001 synergistically inhibits the growth of breast cancer stem cells in vivo. *Oncol Rep*, 36: 356-364.
119. Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, Won H, Wong W, Berger M, de Stanchina E, Barratt DG, Cosulich S,



- Klinowska T, Rosen N, Shokat KM. (2016) Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*, 534: 272-276.
120. Xie J, Wang X, Proud CG. (2016) mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*, 5: 2078-2089.
  121. Antonuzzo L, Del Re M, Barucca V, Spada F, Meoni G, Restante G, Danesi R, Di Costanzo F, Fazio N. (2017) Critical focus on mechanisms of resistance and toxicity of m-TOR inhibitors in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Treat Rev*, 57: 28-35.
  122. Kaplan B, Qazi Y, Wellen JR. (2014) Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplant Rev (Orlando)*, 28: 126-133.
  123. Creel PA. (2009) Management of mTOR inhibitor side effects. *Clin J Oncol Nurs*, 13: 19-23.
  124. Pallet N, Legendre C. (2013) Adverse events associated with mTOR inhibitors. *Expert Opin Drug Saf*, 12: 177-186.
  125. Francipane MG, Lagasse E. (2014) mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget*, 5: 49-66.
  126. Roulin D, Cerantola Y, Dormond-Meuwly A, Dermartines N, Dormond O. (2010) Targeting mTORC2 inhibits colon cancer cell proliferation in vitro and tumor formation in vivo. *Mol Cancer*, 9: 57-61.
  127. Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, Lee EY, Silva SR, Bowen KA, Gao T, Evers BM. (2009) Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 15: 7207-7216.
  128. Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, Sinnamon MJ, Lee L, Chen PC, Bronson RT, Martin ES, HUNG KE. (2011) The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PLoS One*, 6: e25132.
  129. Yang F, Gao JY, Chen H, Du ZH, Zhang XQ, Gao W. (2017) Targeted inhibition of the phosphoinositide 3-kinase impairs cell proliferation, survival, and invasion in colon cancer. *Onco Targets Ther*, 10: 4413-4422.

130. Lu M, Zessin AS, Glover W, Hsu DS. (2017) Activation of the mTOR Pathway by Oxaliplatin in the Treatment of Colorectal Cancer Liver Metastasis. *PLoS One*, 12: e0169439.
131. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. (2008) Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 26: 1603-1610.
132. Punt CJ, Boni J, Brunsch U, Peters M, Thielert C. (2003) Phase I and pharmacokinetic study of CCI-779, a novel cytostatic cell-cycle inhibitor, in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*, 14: 931-937.
133. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA 3<sup>rd</sup>, Greco FA, Shih KC, Thompson DS, Lane CM, Finney LH, Jones SF. (2015) A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 33: 463-471.
134. Wang D, Chen J, Guo F, Chen H, Duan Z, Wei MY, Xu QM, Wang LH, Zhong MZ. (2011) Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12: 2581-2584.
135. Wen M, Li B, Cao X, Weng C, Wu Y, Fang X, Zhang X, Liu G. (2014) Clinical significance of aberrant mammalian target of rapamycin expression in stage IIIB colon cancer. *Oncol Lett*, 8: 1080-1086.
136. Li S, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X, Guo J. (2014) Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 14: 376-385.
137. Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, HAn Y, Rychahou PG, Doan HQ, Weiss HL, Evers BM. (2010) Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg*, 210: 767-778.
138. Vassilakopoulou M, Parisi F, Siddiqui S, England AM, Zarella ER, Anagnostou V, Kluger Y, Hicks DG, Rimm DL, Neumeister VM. (2015) Preanalytical

- variables and phosphoepitope expression in FFPE tissue: quantitative epitope assessment after variable cold ischemic time. *Lab Invest*, 95: 334-341.
139. Sebestyén A, Sticz TB, Márk Á, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Nagy N, Váradi Z, Kopper L. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 25: 1623-1628.
  140. Alqurashi N, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. (2013) Clinical impacts of mammalian target of rapamycin expression in human colorectal cancers. *Hum Pathol*, 44: 2089-2096.
  141. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S, Li T. (2015) Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 3882-3891.
  142. Cheaib B, Auguste A, Leary A. (2015) The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer*, 34: 4-16.
  143. Sebestyén A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Molnár A, Végső G, Barna G, Kopper L. (2015) Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas. *Cytokine*, 73: 219-224.
  144. Martz CA, Ottina KA, Singleton KR, Jasper JS, Wardell SE, Peraza-Penton A, Anderson GR, Winter PS, Wang T, Alley HM, Kwong LN, Cooper ZA, Tetzlaff M, Chen PL, Rathmell JC, Flaherty KT, Wargo JA, McDonnell DP, Sabatini DM, Wood KC. (2014) Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance. *Sci Signal*, 7: ra121.
  145. Sabatini DM. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 6: 729-34.
  146. Pusceddu S, Tessari A, Testa I, Procopio G. (2014) Everolimus in advanced solid tumors: when to start, early or late? *Tumori*, 100: e2-3.
  147. Costello BA, Borad MJ, Qi Y, Kim GP, Northfelt DW, Erlichman C, Alberts SR. (2014) Phase I trial of everolimus, gemcitabine and cisplatin in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*, 32: 710-716.
  148. Hassan B, Akcakanat A, Sangai T, Evans KW, Adkins F, Eterovic AK, Zhao H, Chen K, Chen H, Do KA, Xie SM, Holder AM, Naing A, Mills GB, Meric-Bernstam F. (2014) Catalytic mTOR inhibitors can overcome intrinsic and acquired resistance to allosteric mTOR inhibitors. *Oncotarget*, 5: 8544-8557.

149. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497: 217-223.
150. Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, Micsik T, Kopper L, Sebestyén A. (2017) mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol*, 70: 410-416.
151. Liu L, Chen L, Chung J, Huang S. (2008) Rapamycin inhibits F-actin reorganization and phosphorylation of focal adhesion proteins. *Oncogene*, 27: 4998-5010.
152. Wainberg ZA, Soares HP, Patel R, DiCarlo B, Park DJ, Liem A, Wang HJ, Yonemoto L, Martinez D, Laux I, Brennan M, Hecht JR. (2015) Phase II trial of everolimus in patients with refractory metastatic adenocarcinoma of the esophagus, gastroesophageal junction and stomach: possible role for predictive biomarkers. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76: 61-67.
153. Park JH, Ryu MH, Park SR, Na YS, Rhoo BY, Kang YK. (2015) Successful control of heavily pretreated metastatic gastric cancer with the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) in a patient with PIK3CA mutation and pS6 overexpression. *BMC Cancer*, 15: 119-125.
154. Mohd Sharial MS, Crown J, Hennessy BT. (2012) Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Ann Oncol*, 23: 3007-3016.
155. Roohi A, Hojjat-Farsangi M. (2017) Recent advances in targeting mTOR signaling pathway using small molecule inhibitors. *J Drug Target*, 25: 189-201.
156. Spindler KL, Sorensen MM, Pallisgaard N, Andersen RF, Havelund BM, Ploen J, Lassen U, Jakobsen AK. (2013) Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol*, 52: 963-970.
157. Harada K, Miyake H, Kumano M, Fujisawa M. (2013) Acquired resistance to temsirolimus in human renal cell carcinoma cells is mediated by the constitutive activation of signal transduction pathways through mTORC2. *Br J Cancer*, 109: 2389-2395.

158. Gao F, Huang C, Zhang Y, Sun R, Zhang Y, Wang H, Zhang S. (2016) Combination targeted therapy of VEGFR inhibitor, sorafenib, with an mTOR inhibitor, sirolimus induced a remarkable response of rapid progressive Uterine PEComa. *Cancer Biol Ther*, 17: 595-598.
159. Martin R, Desponds C, Eren RO, Quadroni M, Thome M, Fasel N. (2016) Caspase-mediated cleavage of raptor participates in the inactivation of mTORC1 during cell death. *Cell Death Discov*, 2: 16024-16035.
160. Wang Z, Martin D, Molinolo AA, Patel V, Iglesias-Bartolome R, Degese MS, Vitale-Cross L, Chen Q, Gutkind JS. (2014) mTOR co-targeting in cetuximab resistance in head and neck cancers harboring PIK3CA and RAS mutations. *J Natl Cancer Inst*, 106: 215-226.
161. Li B, Gao S, Wei F, Bellail AC, Hao C, Liu T. (2012) Simultaneous targeting of EGFR and mTOR inhibits the growth of colorectal carcinoma cells. *Oncol Rep*, 28: 15-20.
162. Serrano-Heras G, Cuenca-López MD, Montero JC, Corrales-Sanchez V, Morales JC, Núñez LE, Morís F, Pandiella A, Ocana A. (2015) Phospho-kinase profile of colorectal tumors guides in the selection of multi-kinase inhibitors. *Oncotarget*, 6: 31272-31283.
163. Kim JS, Kim JE, Kim K, Lee J, Park JO, Lim HY, Park YS, Kang WK, Kim ST. (2017) The Impact of Cetuximab Plus AKT- or mTOR- Inhibitor in a Patient-Derived Colon Cancer Cell Model with Wild-Type RAS and PIK3CA Mutation. *J Cancer*, 8: 2713-2719.
164. Lim SM, Kim HR, Cho EK, Min YJ, Ahn JS, Ahn MJ, Park K, Cho BC, Lee JH, Jeong HC, Kim EK, Kim JH. (2016) Targeted sequencing identifies genetic alterations that confer primary resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor (Korean Lung Cancer Consortium). *Oncotarget*, 7: 36311-36320.
165. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, Iwata KK, Gibson NW, Griffin G. (2006) Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther*, 5: 2676-2684.

166. Leisching GR, Loos B, Botha MH, Engelbrecht AM. (2015) The role of mTOR during cisplatin treatment in an in vitro and ex vivo model of cervical cancer. *Toxicology*, 335: 72-78.
167. Liu J, Zhang L, Zhang X, Xing X. (2015) Rapamycin enhanced the antitumor efficacy of oxaliplatin in cisplatin-resistant ovarian cancer cells A2780cis both in vitro and in vivo. *J Chemother*, 27: 358-364.
168. Im-aram A, Farrand L, Bae SM, Song G, Song YS, Han JY, Tsang BK. (2013) The mTORC2 component rictor contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *PLoS One*, 8: e75455.
169. Kim A, Lee JE, Lee SS, Kim C, Lee SJ, Jang WS, Park S. (2013) Coexistent mutations of KRAS and PIK3CA affect the efficacy of NVP-BEZ235, a dual PI3K/MTOR inhibitor, in regulating the PI3K/MTOR pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 133: 984-996.
170. Yang F, Qian XJ, Qin W, Deng R, Wu XQ, Qin J, Feng GK, Zhu XF. (2013) Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 has a therapeutic potential and sensitizes cisplatin in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 8: e59879.
171. Hecht JR, Reid TR, Garrett CR, Beck JT, Davidson SJ, Mackenzie MJ, Brandt U, Rizvi S, Sharma S. (2015) Phase I study of everolimus, cetuximab and irinotecan as second-line therapy in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res*, 35: 1567-1573.
172. Severyn B, Nguyen T, altman MD, Li L, Nagashima K, Naumov GN, Sathyanarayanan S, Cook E, Morris E, Ferrer M, Arthur B, Benita Y, watters J, Loboda A, Hermes J, Gilliland DG, Cleary MA, Carroll PM, Stack P, Tudor M, Andersen JN. (2016) Development of a High-Throughput Gene Expression Screen for Modulators of RAS-MAPK Signaling in a Mutant RAS Cellular Context. *J Biomol Screen*, 21: 989-997.
173. Pohl M, Schmiegeler W. (2016) Therapeutic Strategies in Diseases of the Digestive Tract - 2015 and Beyond Targeted Therapies in Colon Cancer Today and Tomorrow. *Dig Dis*, 34: 574-579.
174. Kim ST, Kim SY, Klempner SJ, Yoon J, Kim N, Ahn S, Bang H, Kim KH, Park W, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, Lee SH, Park K, Kang WK, Lee J. (2017)

- Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition. *Ann Oncol*, 28: 547-554.
175. McCoach CE, Bivona TG, Blakely CM, Doebele RC. (2016) Neoadjuvant Oncogene-Targeted Therapy in Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer as a Strategy to Improve Clinical Outcome and Identify Early Mechanisms of Resistance. *Clin Lung Cancer*, 17: 466-469.
  176. Chen DH, Zhang XS. (2015) Targeted therapy: resistance and re-sensitization. *Chin J Cancer*, 34: 496-501.
  177. Cheng H, Zou Y, Ross JS, Wang K, Liu X, Halmos B, Ali SM, Liu H, Verma A, Montagna C, Chachoua A, Goel S, Schwartz EL, Zhu C, Shan J, Yu Y, Gritsman K, Yelensky R, Lipson D, Otto G, Hawryluk M, Stephens PJ, Miller VA, Pipher B, Perez-Soler R. (2015) RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov*, 5: 1262-1270.

## **X. Saját publikációk jegyzéke**

### **A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények**

**Tamás Sticz**, Anna Molnár, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Noémi Nagy, Gyula Végső, Tamás, Micsik László Kopper, Anna Sebestyén

mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression.

J Clin Pathol. 2017; 70(5): 410-416. doi:10.1136/jclinpath-2016-203913 **IF: 2,687**

Anna Sebestyén\*, **Tamás Béla Sticz\***, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Botond Timár, Karolina Nemes, Noémi Nagy, Zsófia Váradi, László Kopper \*equal contribution  
Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas—a tissue microarray study.

Mod Pathol. 2012; 25(12):1623-8. doi: 10.1038/modpathol.2012.141 **IF: 5,253**

**Tamás Sticz\***, Anna Molnár\*, Titanilla Dankó, Zoltán Hujber, Noémi Nagy, Gyula Végső, László Kopper, Anna Sebestyén \*equal contribution

The effects of different mTOR inhibitors in EGFR inhibitor resistant colon carcinoma cells

- benyújtott közlemény, elbírálás alatt Pathol Oncol Res. c. folyóirat

### **A disszertációtól független saját közlemények**

Karolina Nemes, Anna Sebestyén, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, István Kenessey, **Tamas Sticz**, Eszter Nagy, Gábor Barna, Zsófia Váradi, Gábor Kovács, László Kopper, Mónika Csóka

Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Plos One. 2013; 8(4):e59335. doi: 10.1371/journal.pone.0059335 **IF: 3,534**



Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Zsófia Váradi, **Tamás Béla Sticz**, Noémi Nagy, Judit Csomor, Lajos Berczi, Viktória Varga, Mónika Csóka, László Kopper, Anna Sebestyén  
Characteristic mTOR activity in Hodgkin- lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease – a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study.  
BMC Cancer. 2013,13:250. doi: 10.1186/1471- 2407-13-250. **IF: 3,319**

Tímea Pócza, Anna Sebestyén, Eszter Turányi, Tibor Krenács, Ágnes Márk, **Tamás Béla Sticz**, Zsuzsanna Jakab, Péter Hauser  
mTOR pathway as a potential target in a subset of human medulloblastoma.  
Pathol Oncol Res. 2014; 20:893-900. doi: 10.1007/s12253-014-9771-0. **IF: 1,855**

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki értékes szakmai tanácsaival, hasznos útmutatásaival, valamint tapasztalataival segítette és irányította munkámat. Nélküle ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kopper László Professzor Úrnak, hogy az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Ph.D. programjában lehetőséget biztosított számomra a kutatáshoz és munkám során segítséget nyújtott.

Köszönet illeti Dr. Matolcsy András Professzor Urat, aki lehetővé tette számomra, hogy tudományos munkámat az Intézetben végezhessem.

Nagy hálával tartozom a Tumorbiológia Labor jelenlegi és korábbi munkatársainak (Böszörményi Judit, Csorba Gézané, Dr. Hajdu Melinda, Dr. Hujber Zoltán, Dr. Krencz Ildikó, Mallászné Bagi Györgyi, Dr. Márk Ágnes, Dr. Nemes Karolina, Nagy Noémi, Petővári Gábor, Dankó Titanilla, Váradi Zsófia), akik mindig barátként, szinte családtagként fogadtak és bántak velem. Köszönöm, hogy velük dolgozhattam.

Hálával gondolok Csorba Gézanéra, akitől a sejt- és szövettenyésztés alapjait elsajátíthattam. Köszönettel tartozom Molnár Annának, aki kitartó munkájával mindig nagy segítségemre volt, Dr. Márk Ágnesnek a rengeteg segítségéért, amit a sikeres laboratóriumi munkához kaptam. Köszönöm Dr. Krenács Tibornak és Parsch Editnek a sok segítséget, amit a TMA készítése során nyújtottak. Köszönöm Dr. Hajdu Melindának és Dr. Micsik Tamásnak és Kopper László professzor úrnak hogy patológiai szaktudásukkal segítségemre álltak, valamint Dr. Barna Gábornak, hogy a segítségével és irányításával az áramlási citometria vizsgálatokat elvégezhettem.

Tisztelettel és hálás köszönettel tartozom azoknak a klinikusoknak, akik által gondozott onkológiai betegek anyagait és adatait a vizsgálatomban felhasználhattam és természetesen vizsgálatban résztvevő betegeknek.

Köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy türelmükkel, szeretetükkel, bátorító támogatásukkal, végig mellettem álltak és ezzel is segítették munkámat.